

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ ХИМИИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

ПРИВАР ЮЛИЯ ОЛЕГОВНА

**КРИОГЕЛИ ХИТОЗАНА, СШИТЫЕ ДИГЛИЦИДИЛОВЫМИ  
ЭФИРАМИ: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ**

Специальность 1.4.4. Физическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата наук

Научный руководитель:  
чл.-корр. РАН,  
доктор химических наук  
Братская С.Ю.

Владивосток 2025

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	12
1.1 Способы сшивки хитозана .....	13
1.2 Способы получения широкопористых полимерных материалов .....	19
1.2.1 Лиофилизация.....	19
1.2.2 Пенообразование .....	21
1.2.3 Выщелачивание темплатов .....	23
1.2.4 Криогелирование или криотропное гелеобразование .....	25
1.3 Применение криогелей хитозана .....	32
1.3.1 Сорбенты на основе криогелей хитозана.....	32
1.3.2 Криогели как носители катализаторов.....	36
1.3.3 Биомедицинское применение криогелей хитозана.....	39
1.3.3.1 Устойчивость хитозана и материалов на его основе к ферментативному гидролизу .....	40
1.3.3.2 Криогели для культивирования клеток .....	42
ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	45
2.1. Материалы.....	45
2.2 Приготовление растворов хитозана .....	45
2.3 Определение времени гелеобразования.....	46
2.4 Исследование гелеобразования при температуре +25 °С .....	46
2.5 Получение криогелей хитозана.....	47
2.6 Характеризация криогелей хитозана.....	48
2.6.1 Элементный состав и ИК-Фурье спектроскопия .....	48
2.6.2 Набухание, проницаемость и морфология криогелей.....	48
2.6.3 Механические свойства криогелей .....	50
2.7 Исследование сорбционных свойств криогелей хитозана.....	51

2.8 Получение и исследование свойств композитных катализаторов на основе криогелей хитозана .....	54
2.9 Биологические свойства криогелей хитозана .....	55
2.9.1 Ферментативный гидролиз криогелей хитозана.....	55
2.9.2 Оценка цитотоксичности сшивающих реагентов и криогелей хитозана по отношению к опухолевым клеткам человека и применение криогелей для трехмерного культивирования клеток .....	56
2.9.3 Исследование биосовместимости криогелей хитозана <i>in vivo</i> .....	58
<b>ГЛАВА 3 ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЕ И КРИОТРОПНОЕ ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЕ В РАСТВОРАХ ХИТОЗАН-ДИГЛИЦИДИЛОВЫЕ ЭФИРЫ (ДЭ).....</b>	<b>60</b>
3.1 Гелеобразование в растворах хитозан-ДЭ.....	60
3.2 Криотропное гелеобразование в растворах хитозан-ДЭ.....	64
3.3 Особенности механизма сшивки хитозана ДЭ в уксуснокислых и солянокислых растворах.....	68
<b>ГЛАВА 4 ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ НА МОРФОЛОГИЮ И СВОЙСТВА КРИОГЕЛЕЙ ХИТОЗАНА, СШИТЫХ ДИГЛИЦИДИЛОВЫМИ ЭФИРАМИ.....</b>	<b>78</b>
4.1 Морфология, набухание и проницаемость криогелей хитозана .....	78
4.2 Механические свойства криогелей хитозана .....	81
4.3 Устойчивость криогелей хитозана к ферментативному гидролизу.....	86
<b>ГЛАВА 5 ПРИМЕНЕНИЕ КРИОГЕЛЕЙ ХИТОЗАНА .....</b>	<b>90</b>
5.1 Сорбционные свойства монолитных криогелей хитозана .....	90
5.2 Применение криогелей хитозана в качестве носителей катализаторов .....	96
5.3 Биомедицинское применение криогелей хитозана.....	100
5.3.1 Цитосовместимость криогелей хитозана и применение для 3D культивирования клеток.....	100
5.3.2 Биосовместимость криогелей хитозана .....	102

ВЫВОДЫ .....	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 .....	131
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 .....	133
БЛАГОДАРНОСТИ .....	134

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

Интерес к материалам на основе хитозана для применения в качестве сорбентов, носителей катализаторов, средств доставки лекарств, скаффолдов для культивирования клеток и регенерации тканей неуклонно растет в последние несколько десятилетий. По сравнению с гидрогелями широкопористые материалы, к которым относят материалы с размером пор более 50 мкм, обладают рядом преимуществ. Открытая пористая структура обеспечивает эффективный транспорт жидкости через весь объем материала, более высокую механическую прочность при больших деформациях, эластичность [1–3]. Для достижения требуемых эксплуатационных характеристик материалов различного назначения, полученных на основе хитозана, в большинстве случаев требуется сшивка, обеспечивающая их стабильность и нерастворимость в широком диапазоне рН. Варьирование типа и плотности сшивок влияет на количество свободных аминогрупп, биосовместимость и цитотоксичность, является важным инструментом настройки механических и сорбционных свойств материалов, их устойчивости к ферментативному гидролизу.

К настоящему времени разработаны различные подходы к получению объёмных широкопористых материалов на основе хитозана. Наиболее предпочтительным подходом является формирование пористой структуры в процессе сшивки полимера, однако использование для этого шаблонов в форме мицелл, эмульсий и неорганических частиц увеличивает количество стадий получения материала и может приводить к нежелательным изменениям свойств материалов из-за неполного удаления шаблонов. В связи с этим особенно привлекательным способом генерации пористой структуры является криогелирование или криотропное гелеобразование, когда шаблонами служат кристаллы растворителя, легко удаляемые при оттаивании. Для успешного применения данного метода к получению криогелей хитозана необходима

достаточно высокая реакционная способность сшивающего агента при отрицательных температурах в кислой среде, где хитозан полностью растворим. Из спектра сшивающих реагентов, наиболее часто применяющихся для сшивки хитозана, полностью удовлетворяет этим требованиям только глутаровый альдегид (ГА). Однако материалы, сшитые ГА, отличаются токсичностью при высоких степенях сшивки, хрупкостью, нестабильностью во времени, интенсивной окраской и небольшим размером пор. В связи с чем высокую актуальность сохраняет поиск альтернативных ГА реагентов для получения криогелей хитозана.

### **Степень проработанности темы**

Наиболее перспективным типом сшивающих реагентов для получения криогелей хитозана, на наш взгляд, являются диглицидиловые эфиры (ДЭ). Помимо высокой биосовместимости получаемых с их применением материалов, за счет высокой гидрофильности ДЭ могут обеспечить дополнительно пластифицирующий эффект, решая проблему хрупкости криогелей, сшитых ГА. Однако из-за высокой реакционной способности ДЭ только при  $\text{pH} > 10$ , где хитозан нерастворим, пористые материалы, сшитые ДЭ, ранее удалось получить только путем стабилизации структуры предварительно лиофилизованного хитозана (криоструктурата) в щелочной среде при  $+60\text{ }^\circ\text{C}$  [1]. В других работах по сшивке хитозана ДЭ в кислых средах реакцию проводили при повышенной температуре и, как правило, при мольном избытке ДЭ [4–6]. Задача снижения хрупкости материалов на основе хитозана за счет использования гибкоцепных сшивающих агентов систематически не решалась, единичные успешные примеры ограничиваются введением фрагмента полиэтиленгликоля (ПЭГ) через концевую альдегидную группу, что приводит к необходимости очистки продукта реакции диализом для обеспечения высокой биосовместимости [7].

Таким образом, до начала данного исследования успешных примеров применения ДЭ с разной длиной цепи для сшивки хитозана в кислых средах в

частично замороженных растворах известно не было, хотя такие попытки предпринимались рядом исследователей.

### **Цель работы**

Исследовать взаимодействие диглицидиловых эфиров (ДЭ) с хитозаном в кислой среде и разработать способ получения криогелей хитозана с настраиваемыми функциональными свойствами с применением ДЭ в качестве сшивающих реагентов.

Для достижения поставленной цели решались следующие **научные задачи**:

1. Изучить факторы, влияющие на гелеобразование в растворах хитозана в присутствии ДЭ.
2. Установить корреляции между условиями сшивки хитозана ДЭ в частично замороженных растворах, морфологией и свойствами полученных криогелей.
3. Исследовать эффективность применения криогелей хитозана, сшитых ДЭ, в качестве сорбентов и носителей катализаторов.
4. Исследовать цитотоксичность и биосовместимость полученных криогелей хитозана, возможность их применения для культивирования клеток и регенерации тканей.

### **Научная новизна**

1. Впервые изучены особенности гелеобразования в уксуснокислых и солянокислых растворах хитозана в присутствии ДЭ. Установлено, что причиной низкой эффективности сшивки хитозана ДЭ в уксуснокислых растворах является расход ДЭ на побочную реакцию образования сложного эфира уксусной кислоты.
2. Разработан способ получения криогелей хитозана, сшитых ДЭ. Впервые показано, что криогели хитозана могут быть получены даже при низкой концентрации ДЭ, соответствующей мольному отношению ДЭ:хитозан 1:20. Установлено, что одним из важных преимуществ ДЭ перед ГА как

сшивающих реагентов является более низкая скорость сшивки, обеспечивающая формирование криогелей с большим размером пор (до 230 мкм) и более высокой проницаемостью.

3. Впервые установлены ранее неизвестные корреляции между условиями ковалентной сшивки хитозана в частично замороженных растворах, морфологией и свойствами криогелей хитозана, сшитых ДЭ. Показано, что проницаемость, набухание, механические свойства и устойчивость к ферментативному гидролизу криогелей хитозана можно настраивать, изменяя длину цепи ДЭ и степень сшивки.
4. С учетом проницаемости, механических свойств и сорбционной емкости криогелей хитозана обоснованы критерии выбора ДЭ и степени сшивки для получения эффективных монолитных сорбентов и носителей катализаторов.
5. Впервые установлено, что морфология клеточных агрегатов, формирующихся при 3D культивировании в криогелях хитозана, сшитых ДЭ с разной длиной цепи, зависит от состава криогелей.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Факторы, влияющие на эффективность гелеобразования в растворах хитозана в присутствии ДЭ.
2. Способ получения криогелей хитозана, сшитых ДЭ, и корреляции между условиями получения, морфологией и свойствами криогелей.
3. Результаты исследования цитотоксичности и биосовместимости криогелей хитозана, сшитых ДЭ, и их применения для 3D культивирования клеток.
4. Экспериментальное обоснование критериев выбора ДЭ и степени сшивки для получения на основе криогелей хитозана сорбентов и носителей катализаторов.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Впервые показано, что длина цепи ДЭ, рН и природа кислоты, в которой растворен полимер, являются основными факторами, определяющими

эффективность сшивки хитозана ДЭ как при комнатной температуре, так и в частично замороженных растворах. Установленные закономерности прохождения целевой и побочной реакций эпоксидных групп с аминогруппами хитозана в кислой среде могут быть использованы для расширения методических подходов к функционализации хитозана в гомогенных условиях без использования реагентов, содержащих альдегидную группу. Практическая значимость исследования заключается в разработке способа получения новых широкопористых высокоэластичных материалов на основе хитозана (патент РФ № 2699562) для применения в клеточных технологиях и тканевой инженерии, сорбции и катализе.

### **Методология и методы диссертационного исследования**

Результаты диссертационной работы получены с использованием современных методов исследования, включающих ИК-Фурье спектроскопию, СНН-анализ, осцилляционную реологию, динамический механический анализ, конфокальную лазерную сканирующую микроскопию. Сорбционные свойства материалов исследованы в статических и в динамических условиях с применением для анализа UV-vis спектроскопии. Исследования цитосовместимости криогелей проведены на постоянных линиях клеток человека с применением световой микроскопии и цитометрии. Биосовместимость криогелей исследована *in vivo* на животной модели (мышь) в соответствии с общепринятыми этическими нормами и правилами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS №123).

**Достоверность полученных результатов** обеспечена применением совокупности взаимодополняющих физико-химических методов исследования; хорошей воспроизводимостью результатов; использованием статистических методов обработки экспериментальных данных; обсуждением установленных закономерностей на тематических российских и международных научных мероприятиях; публикацией результатов исследования в высокорейтинговых рецензируемых научных изданиях.

**Работа выполнена** в лаборатории органических и гибридных функциональных материалов под руководством чл.-корр. РАН, д.х.н. С.Ю. Братской.

**Личный вклад автора** заключался в анализе научной литературы по теме исследования, получении и обработке основной части экспериментальных данных, участии в обсуждении полученных результатов и подготовке публикаций, докладов на конференциях, в том числе международных. Часть исследований выполнена к.б.н. Бородой А.В., Малышевым Д.Д. (3D культивирование клеток и исследование цитотоксичности методом проточной цитометрии) и к.б.н. Майоровой М.А. (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия) в ННЦМБ ДВО РАН; к.х.н. Нестеровым Д.В. (исследование биосовместимости на животной модели) в ИОС УрО РАН. Автор принимал непосредственное участие в обработке, анализе и интерпретации всех полученных данных.

Работа выполнена автором в соответствии с планами исследований по проекту РФФИ № 20-13-00399 и государственному заданию ИХ ДВО РАН, темы № FWFN (0205)-2022-0002 и № FWFN (0205)-2025-0002.

### **Апробация работы**

Основные положения и результаты диссертационной работы были доложены на XII научной сессии-конкурсе молодых учёных ИХ ДВО РАН, посвященной 50-летию Института химии ДВО РАН (Владивосток, 2021), диплом за 2-е место; III Зезинской школе-конференции для молодых учёных «Химия и физика полимеров» (Москва, 2023), диплом I степени; Шестнадцатой Всероссийской конференции с международным участием «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Владивосток, 2023); XIII научной сессии-конкурсе молодых учёных ИХ ДВО РАН, посвященной 300-летию Российской академии наук (Владивосток, 2024); XXII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Сочи, 2024).

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано **11** печатных работ, включая **5** статей в рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы цитирования: Polysaccharides, Gels, Biomimetics, Biomacromolecules, Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives, **1** патент РФ на изобретение и **5** тезисов докладов научных конференций.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.4 – Физическая химия (химические науки) в пунктах: 3. «Определение термодинамических характеристик процессов на поверхности, установление закономерностей адсорбции на границе раздела фаз и формирования активных центров на таких поверхностях»; 9. «Связь реакционной способности реагентов с их строением и условиями осуществления химической реакции».

### **Структура и объем диссертации**

Работа состоит из введения, пяти глав, выводов, списка сокращений и обозначений, списка литературы из 201 наименований. Работа изложена на 134 страницах, содержит 35 рисунков, 5 схем, 4 таблицы и 2 приложения.

## ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Гидрогели и криогели на основе биополимеров привлекают все большее внимание для различных применений в биомедицине [8–11], носимой электронике [12], адсорбции и обнаружении загрязняющих веществ [2,13,14], катализе [15] и других областях. Широкопористые материалы, в том числе криогели на основе хитозана нашли применение в качестве средств доставки лекарств с контролируемым высвобождением, скаффолдов в тканевой инженерии, раневых покрытиях [16–19], сорбентов для извлечения и разделения ионов [20], иммобилизации [21] и очистки белков [22]. По сравнению с гидрогелями, криогели имеют открытую пористую структуру, обеспечивающую эффективный поток жидкости при разделении или инфильтрации клеток в биомедицинских устройствах, более высокую механическую прочность, эластичность и быструю реакцию на внешние стимулы [23,24]. Все эти характеристики зависят не только от природы полимера, но и от условий криогелирования, типа и плотности сшивки, которые должны быть настроены так, чтобы имитировать механические свойства различных тканей организма [3,25,26] и контролировать скорость резорбции полимерной матрицы [3] для биомедицинского применения или обеспечивать сохранение достаточного количества активных функциональных групп при хороших гидродинамических свойствах для применения в проточных фильтрах и реакторах [2].

В данном обзоре рассматриваются способы сшивки хитозана, подходы к формированию широкопористых материалов на его основе, а также некоторые области применения таких материалов.

## 1.1 Способы сшивки хитозана

Варьирование типа и плотности сшивок является важным инструментом для настройки механических свойств, набухания, деградации и других характеристик ковалентно сшитых полимерных материалов [27–31]. Для достижения требуемых эксплуатационных характеристик материалов различного назначения на основе хитозана в большинстве случаев также требуется сшивка, обеспечивающая нерастворимость полимера в широком диапазоне рН.

Различают физическую и химическую сшивки. Физические сшивки, формируемые, например, за счет образования водородных связей, в большинстве случаев имеют обратимый характер, в результате получаются механически нестабильные гидрогели. Химическая сшивка даёт в целом более прочные структуры с механическими свойствами, типичными для жестких 3D систем.

За счёт наличия аминных и гидроксильных групп сшивка хитозана может происходить с образованием ионной или ковалентной связи [32], а дополнительная стабилизация трёхмерной структуры возможна также за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий [33,34]. Теоретически хитозан может образовывать ионные сшивки с любым химическим соединением, которое обладает по меньшей мере двумя анионными функциональными группами – карбоксильными и фосфатными группами, сульфогруппами и др. [35]. В литературе наиболее часто встречаются примеры ионной сшивки для хитозана с применением фосфорной кислоты или полифосфатов [36], лимонной [37], серной [38], дубильной [39] и янтарной [40] кислот.

Ковалентно сшитые гидрогели на основе хитозана получают в кислых средах, где хитозан хорошо растворим и обеспечиваются условия сшивки в гомогенной системе. Глутаровый альдегид (ГА) [41–43] и дженипин [44,45] вступают в реакцию с первичными аминогруппами хитозана, образуя окрашенные основания Шиффа. Гелеобразование растворов хитозана в присутствии ГА происходит в

течение нескольких минут, а скорость сшивки увеличивается с увеличением рН [46,47] за счёт повышения нуклеофильности депротонированных аминогрупп, играющих важную роль в процессе сшивки.

Долгие годы ГА остается наиболее широко используемым сшивающим реагентом для хитозана [48–51]. Однако его популярность основана в большей степени на низкой стоимости и простоте применения, чем на высоком качестве получаемых материалов. Было показано, что ГА цитотоксичен в высоких концентрациях, которые необходимы для изготовления материалов с высокой механической прочностью [48,49]. Удаление непрореагировавших остатков ГА и токсичного боргидрида натрия, используемого для восстановления образовавшегося основания Шиффа, может быть трудоемким и дорогостоящим [3]. Быстрое гелеобразование хитозана даже при низких концентрациях ГА [46,47] препятствует росту кристаллов растворителя в частично замороженных растворах и, таким образом, ограничивает возможности контроля размера пор криогелей хитозана [52].

Помимо ГА существует ещё ряд сшивающих реагентов, способных взаимодействовать с хитозаном в кислой среде. Например, диизоцианаты реакционно способны при комнатной температуре, но применяются в неводных растворителях – толуоле [53] или циклогексане [54]. Диазиды, иногда используемые в качестве прекурсоров диизоцианатов в реакциях сшивки, разлагаются с образованием диизоцианатов только при нагревании, таким образом сшивка не может быть проведена при комнатной температуре [55]. Менее распространенным сшивающим реагентом для хитозана является N,N'-метиленбисакриламид [56]. В щелочной среде наиболее популярным сшивающим реагентом является эпихлоргидрин [57]. На Схеме 1 приведены структурные фрагменты хитозана, сшитого с использованием наиболее распространенных реагентов.

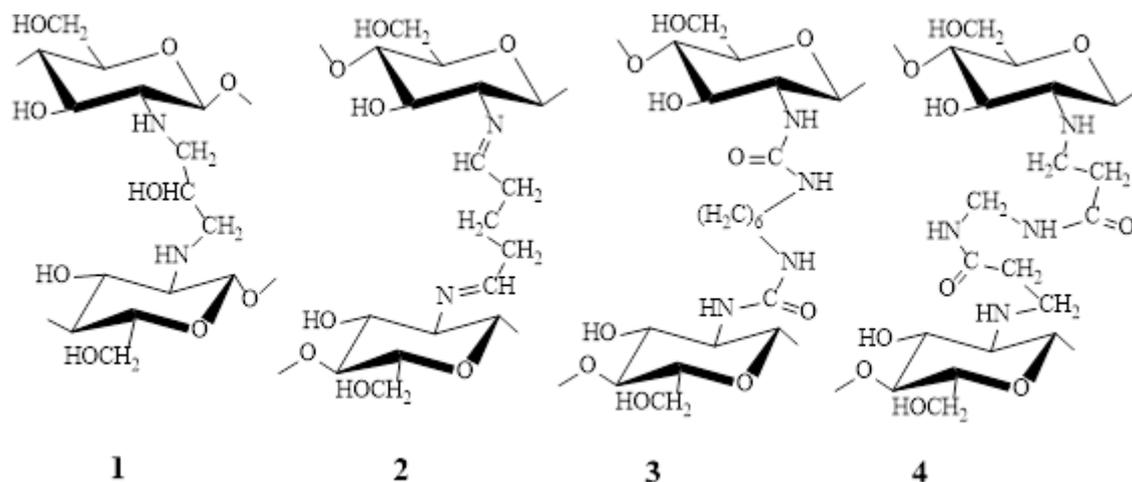


Схема 1 – Структурные фрагменты, образующиеся при сшивке хитозана и его производных эпихлоргидрином – 1, глутаровым альдегидом – 2, гексаметилендиизоцианатом – 3 и N,N'-метиленбисакриламидом – 4

Одним из существенных недостатков материалов на основе хитозана является их хрупкость, что, например, существенно ограничивает самостоятельное применение осажденного в щелочной среде или неводных растворителях хитозана в тканевой инженерии [5]. Помимо использования пластификаторов (глицерина, органических кислот), распространенным способом повышения эластичности полимерных материалов является использование гибкоцепных сшивающих реагентов с достаточно большой длиной цепи. В первую очередь это реализуется с применением полиэтиленгликоля (ПЭГ) [58]. С целью получения инъектируемого геля хитозана такой подход к повышению эластичности был применен с использованием производного ПЭГ с концевой альдегидной группой [59]. На первом этапе хитозан был модифицирован ПЭГ с концевой альдегидной группой с получением имиона (основание Шиффа), который затем был восстановлен цианоборгидридом натрия  $\text{NaCNBH}_3$  (Схема 2). Минимальное содержание привитого ПЭГ для обеспечения растворимости хитозана в воде составляло около 36 массовых %. Авторы показали, что существует определенный диапазон содержания ПЭГ в сополимере с хитозаном, за пределами которого

термообратимый золь-гель переход невозможен. Оптимальное содержание ПЭГ в хитозане в данном исследовании составило 45–55 массовых %.

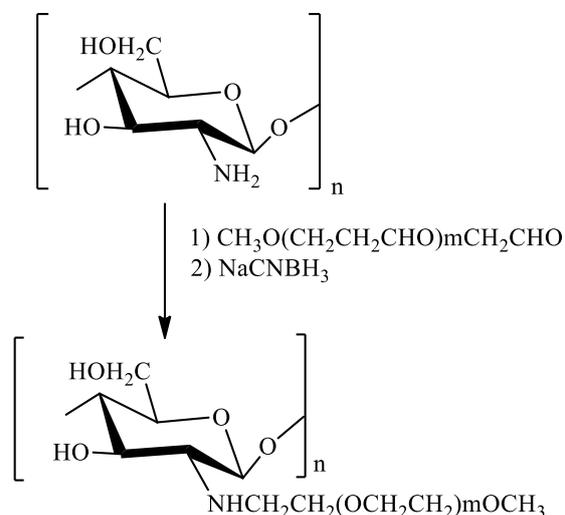


Схема 2 – Схема прививки ПЭГ к хитозану [59]

Похожий способ получения ковалентно сшитых каркасов на основе хитозана с использованием ПЭГ и формальдегида предложен в работе [7]. Реакцию осуществляли следующим образом: 1 г хитозана растворяли в 1%-ной уксусной кислоте, добавляли 750 мг ПЭГ с молекулярной массой 1.5 кДа и 30 мкл формальдегида и выдерживали реакционную смесь 24 ч при комнатной температуре. ПЭГ вступал в реакцию с основанием Шиффа, полученным в результате взаимодействия формальдегида с первичной аминогруппой хитозана. Для обеспечения цито- и биосовместимости полученный гель диализовали относительно бидистиллированной воды в течение 48 ч, замораживали при температуре  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  и затем лиофилизовали для формирования пористого каркаса.

По сравнению со сшивающими реагентами, имеющими концевые альдегидные группы, более перспективными сшивающими реагентами для биомедицинского применения являются диглицидиловые эфиры (ДЭ) [60]. Например, диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола (ДЭБД) используют в качестве

сшивающего реагента в большинстве филлеров на основе гиалуроновой кислоты. Стабильность и безопасность материалов, сшитых ДЭБД, делают его промышленным стандартом в косметологии [60]. Также ДЭ используют для консервации биологических тканей и стабилизации тканеинженерных конструкций, использующихся в качестве имплантатов [61]. Хотя методика фиксации тканевых клапанов биопротезов ГА применяется уже около 30 лет, считается, что решение имеющихся проблем кальцификации и иммуномодулированного воспаления может быть достигнуто только путем разработки альтернативных методов фиксации без использования ГА [62].

Известно, что ДЭ взаимодействуют с белками (коллаген, желатин) и полисахаридами (крахмал, целлюлоза, хитозан) через аминные, гидроксильные или карбоксильные группы [63]. Для установления механизма сшивки белков ДЭ авторы работы [64] исследовали степень и скорость сшивки коллагена ДЭБД. Скорость сшивки была заметно ниже, чем при использовании ГА. При этом сшивка в щелочной среде протекала по аминогруппам остатков гидроксизина, что приводило к получению жесткого и хрупкого материала, тогда как в кислой среде сшивка проходила по карбоксильным группам остатков аспарагиновой или глутаминовой кислот с получением эластичного материала. Сшивка гиалуроновой кислоты диглицидиловым эфиром полиэтиленгликоля (ДЭПЭГ) осуществлялась в сильнощелочной среде с образованием устойчивой к деградации эфирной связи С–О–С [65].

Из-за высокой реакционной способности ДЭ преимущественно при  $pH > 10$  [66,67] и нерастворимости хитозана в щелочных средах этот тип сшивающих веществ ранее практически не использовался для сшивки хитозана и применялся в основном для получения гидрогелей из производных хитозана, растворимых в широком диапазоне pH, таких как карбоксиметилхитозан (КМХ) [68] и гликоль хитозана [69]. В работе [70] пленки хитозана, сформированные осаждением в щелочном растворе, сшивали ДЭБД в изопропанолу при мольном отношении

диэпоксида к аминогруппам хитозана 0.5:1, 1:1 и 5:1. Установлено, что даже при максимальном мольном избытке ДЭБД степень модификации хитозана сшивающим реагентом составила не более 25–35%.

Ограниченные примеры реакций ДЭ с хитозаном в кислых средах включают отверждение при +160–200 °С покрытий на основе диглицидилового эфира бисфенола А (ДЭБА) хитозаном из уксуснокислого раствора [4]; сшивку гидрогелевых пленок из растворов хитозана в 0.4% и 2% уксусной кислоте с использованием ДЭПЭГ при +80 °С [5]; изготовление нановолоконных матов из гидрогеля хитозан/ПВА с использованием ДЭЭГ в качестве сшивающего реагента для хитозана в растворе муравьиной кислоты при +60 °С [6].

В работе [5] описан пример сшивки хитозана ДЭПЭГ в 0.4 % и 2 %-ных растворах уксусной кислоты с получением гидрогелевых плёнок. Авторы варьировали молекулярную массу ПЭГ (1000, 2000 и 4000 Да) и его массовое содержание. Было установлено, что в 2 % растворе уксусной кислоты сшивка не наблюдалась даже при большом избытке ДЭПЭГ, что авторы связали с низкой нуклеофильностью полностью протонированной в этих условиях аминогруппы хитозана. Когда реакцию сшивки проводили в 0.4 % растворе уксусной кислоты, то есть при минимальной ее концентрации, необходимой для растворения хитозана, гидрогели удалось получить при температуре +80 °С и мольных соотношениях хитозан:ДЭПЭГ 1:0.3, 1:0.6, 1:0.9, 1:1.2 и 1:1.45. При этом с увеличением массового содержания ПЭГ в пленках хитозана наблюдали увеличение относительного удлинения при разрыве, т.е. повышение эластичности, которое достигалось за счет снижения прочности пленки.

Однако ни в одном из упомянутых выше исследований не было представлено убедительных доказательств причин низкой эффективности сшивки хитозана ДЭ в кислой среде.

## 1.2 Способы получения широкопористых полимерных материалов

Особое место среди полимерных материалов занимают макропористые (широкопористые) материалы с диаметром пор от нескольких десятков до нескольких сотен микрометров и толщиной стенок в несколько микрометров [71]. Несмотря на то, что согласно классификации ИЮПАК, макропорами считаются поры с диаметром более 50 нм, для рассматриваемых в данном обзоре материалов, получаемых в форме монолитов с высокой проницаемостью и открытой пористой структурой, больше подходит классификация пор по размерам, принятая в науках о жизни [71], согласно которой нанопоры имеют диаметр ( $d$ )  $< 0.1$  мкм, мезопоры  $0.1 \text{ мкм} < d < 100 \text{ мкм}$ , макропоры  $d > 100 \text{ мкм}$ . Для описания материалов с диаметром пор более 10 мкм в русскоязычной литературе чаще встречается термин широкопористые.

### 1.2.1 Лиофилизация

Лиофилизация (сублимационная сушка) – метод получения широкопористых материалов, включающий в себя стадии замораживания раствора полимера с последующим удалением растворителя в вакууме (рисунок 1). Пористость, толщина стенок и размеры пор материалов, полученных этим способом, в основном зависят от давления и температуры при вакуумной сушке и концентрации полимера [72].

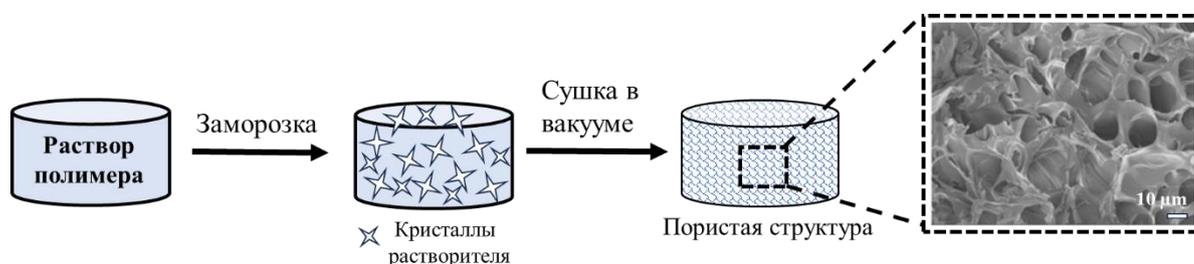


Рисунок 1 – Схема получения пористого материала лиофилизацией. На СЭМ-изображении для примера представлена структура губки из карбоксиметилцеллюлозы и хитозана, полученной методом лиофилизации из раствора с массовым соотношением полимеров 4:6 при pH 5 [73]

В простейшем варианте после лиофилизации раствора хитозана, полученный пористый материал обрабатывают щелочными растворами или неводными растворителями [74], однако это не решает проблему растворимости в кислых средах.

Для расширения рН интервала стабильности таких материалов после перевода хитозана в нерастворимую форму, пористый каркас сшивают теми же реагентами, которые используются для получения гидрогелей хитозана. Так, сшивку криоструктурата, полученного путем лиофилизации уксуснокислого раствора хитозана, проводили с применением дженипина. Авторы отметили, что в этом случае появление синего цвета, характерного для ковалентно сшитого дженипином геля хитозана, наблюдали значительно позже по сравнению со сшивкой в растворе, что объясняли затрудненной диффузией сшивающего реагента в гетерогенных условиях [75].

Лиофилизацией с последующей ионной сшивкой получили пористые губки хитозана для регенерации костной ткани [76]. Для этого 3 %-ный раствор хитозана в уксусной кислоте лиофилизовали, затем сшивали 5 %-ным раствором триполифосфата и вновь подвергали лиофильной сушке. Полученные таким способом хитозановые губки имели пористую структуру с диаметром пор 100–200 мкм, способствующую пролиферации остеобластов крыс.

Лиофильную сушку готовых гидрогелей применяли также для получения пористых материалов на основе полиакриламида (ПАА) и хитозана, сшитых акриламидом (ААм) и N,N'-метиленабисакриламидом (БААм) [77]. Мольное соотношение БААм:ААм варьировали в диапазоне 1:80–1:20. Хитозан (12.6 массовых %) добавляли в каждую реакцию смесь, которую последовательно охлаждали до 0 °С на ледяной бане, продували азотом в течение 20 мин, а затем добавляли 1 мл водного раствора персульфата аммония. Всю смесь перемешивали еще около 20 с, затем погружали в термостатируемую баню при 22 °С на 24 ч. После полимеризации набухшие образцы гелей замораживали в жидком азоте и

лиофилизировали. Гидрогель, полученный при рН 5 при соотношении БААм к ААм 1:80, имел поры с размерами в диапазоне 25–30 мкм. Стенки пор таких гидрогелей были более тонкими по сравнению с гидрогелями, сшитыми при том же значении рН, но при соотношении 1:20. С увеличением количества сшивающего реагента (БААм) получились структуры с размером пор около 45–50 мкм. А с увеличением рН реакционной смеси до 6, размер пор в гидрогелях ПАА/хитозан уменьшился до 10–15 мкм.

В работе [78] гидрофильные композитные губки были получены физической сшивкой хитозана и гидроксibuтил хитозана при массовом соотношении 1:3, 1:2 и 1:1 с последующей заморозкой и сушкой в вакууме. Наличие взаимодействия гидроксibuтил хитозана с гидроксильными группами хитозана было подтверждено методами ИК и  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии. Композитные губки имели более высокую пористость (около 85 %), степень набухания и более низкий индекс свертываемости крови по сравнению с однокомпонентными хитозановыми и гидроксibuтилхитозановыми губками.

Общими недостатками способа получения материалов методом лиофилизации являются многостадийность процесса, ограниченные возможности контроля размера пор, неоднородность матрицы на границе раздела с воздухом, высокие экономические затраты на специальное оборудование [79].

### ***1.2.2 Пенообразование***

Вспенивание исходных растворов полимеров или мономеров, как один из методов генерирования пор, заключается в том, что реакционную смесь насыщают пенообразователем, например, углекислым газом, азотом или другим газом, при высоких давлениях [80]. Затем давление снижается, что приводит к снижению растворимости газа, образованию и росту пузырьков газа в растворе, содержащем прекурсоры гидрогеля. В процессе сшивки полимера или полимеризации мономеров пузырьки газа формируют поры (рисунок 2). Полученные таким

способом материалы обычно обладают низкой плотностью и высокой площадью поверхности [74].

В работе [44] сверхкритический диоксид углерода ( $\text{CO}_2$ ) использовали в качестве «зеленого» порогена для гидрогелей хитозана, сшитых ГА и дженипином. Таким образом были получены материалы с порами диаметром 30–40 мкм.

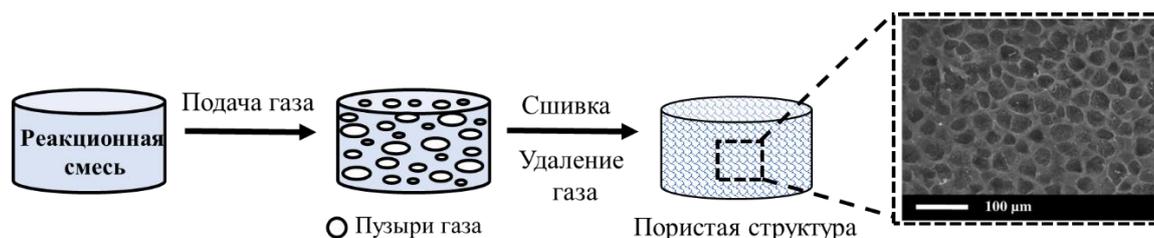


Рисунок 2 – Схема получения широкопористого материала с использованием пенообразователей. На СЭМ-изображении представлена для примера структура гидрогеля хитозана, сшитого ГА, после насыщения раствора  $\text{CO}_2$  под давлением 60 бар [44]

В работе [81] полисахаридные пены с размером пор 50–500 мкм получали на основе альгината, гиалуроната, каррагинанов, хитозана и крахмала путем механического вспенивания водного раствора полимера. Размер пор регулировали, варьируя интенсивность и время вспенивания реакционной смеси.

Известно получение пористых губок для пластической реконструкции повреждённых костных тканей на основе хитозана с молекулярной массой более 300 кДа [82]. Пористая структура формировалась в результате выделения углекислого газа, образующегося при введении карбоната аммония в исходный раствор хитозана. После отверждения, промывки в этаноле и сушки получили пластичную широкопористую губку с пористостью более 85 %. Недостатком этого метода является то, что он не позволяет эффективно регулировать размер пор, требует тщательной отмывки материала от вспомогательных веществ, а полученные материалы при длительном нахождении в растворах набухают с нарушением пористой структуры.

В работе [83] широкопористые материалы на основе хитозана были получены путем сочетания методов микроволнового облучения и пенообразования. В 2 % раствор хитозана в уксусной кислоте добавляли сшивающий реагент глиоксаль и пенообразователь  $\text{NaHCO}_3$ , быстро перемешивали и помещали в микроволновую печь на 90 с. Таким образом, реакции сшивки и пенообразования проходили одновременно. После промывки гидрогелей дистиллированной водой для удаления непрореагировавших компонентов образцы замораживали и сушили в лиофильной сушке. Пористые материалы имели связную структуру пор с диаметром 400–600 мкм.

### ***1.2.3 Выщелачивание темплатов***

Сущность метода заключается в том, что реакцию гелеобразования проводят в присутствии порогенов, например, частиц кремнезема и карбонатов, кристаллов солей, которые по завершению реакции удаляют из трехмерных матриц различными растворителями ( $\text{NaOH}$ , спирт и т.п.) [84]. Размеры пор в таких материалах можно регулировать, варьируя размер частиц порообразователя (рисунок 3).

Таким способом с использованием в качестве порогенов частиц ацетата натрия из растворов хитозана были получены трехмерные пористые материалы с размерами 200–500 мкм для применения в тканевой инженерии [85]. Смесь, содержащую 60 % или 90 % соли от массы полимера, заливали в форму, замораживали при  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 24 ч, а затем лиофилизировали. 3D-структуры, полученные при содержании ацетата натрия 90 %, имели множественные мелкие поры размером 7–30 мкм между основными порами с размером 200–500 мкм (рисунок 3). Модули Юнга полученных материалов составили  $14.4 \pm 1.8$  кПа и  $12.7 \pm 1.3$  кПа при содержании ацетата натрия 60 % и 90 % соответственно.

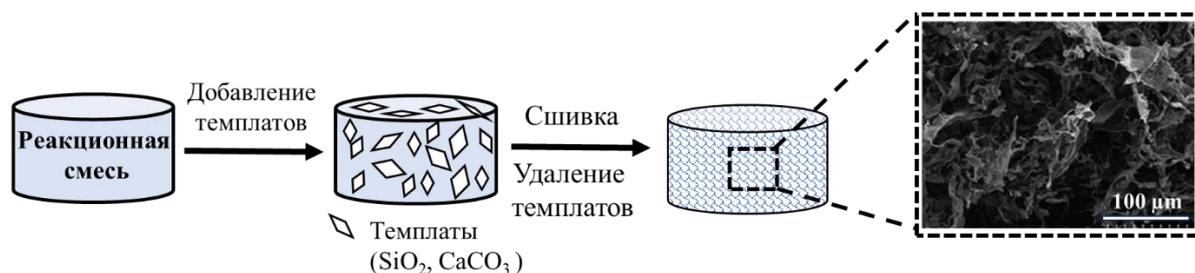


Рисунок 3 – Схема получения широкопористого материала выщелачиванием порообразующего темплата. На СЭМ-изображении представлена для примера структура скаффолда хитозана, полученного при содержании ацетата натрия 60 % [85]

Для оптимизации условий синтеза пористых материалов с контролируемой пористой структурой метод выщелачивания темплатов часто совмещают с лиофильной сушкой. Такой подход был применен в работе [86] для получения пористых частиц хитозана, сшитых дженипином. Роль порообразователя выполнял ПЭГ. В 1.5%-ный уксуснокислый раствор хитозана добавляли ПЭГ до массовых соотношений хитозан:ПЭГ 15:85 и 50:50, затем полученный раствор по каплям добавляли в ванну с 10 %-ным раствором NaOH, интенсивно перемешивая. Полученные частицы хитозана последовательно промывали водой до нейтральной реакции, сшивали 0.05 %-ным раствором дженипина в течение 5 мин и выдерживали в водном растворе при постоянной температуре +90 °С в течение 12 ч для выщелачивания порогена. Далее частицы замораживали при –80 °С и лиофилизовывали. Хитозановые гранулы имели поры размером около  $15 \pm 0.9$  мкм и  $1.5 \pm 0.1$  мкм для образцов с массовым соотношением хитозан: ПЭГ 15/85 и 50/50 соответственно.

К недостаткам метода выщелачивания порообразователей относят сложность удаления всех частиц порообразователя из матрицы, многостадийность процесса, а также необходимость применять органические растворители для удаления органических темплатов и концентрированные растворы кислот и щелочей при удалении неорганических темплатов после сшивки.

### 1.2.4 Криогелирование или криотропное гелеобразование

Криогели – это трехмерные полимерные материалы со взаимосвязанными каналами макропор, которые образуются кристаллами растворителя, чаще всего воды, при физической или химической сшивке полимеров или полимеризации мономеров в частично замороженном растворе (рисунок 4) [26, 51].

Одним из специфических эффектов, характерных для формирования криогелей, является криоконцентрирование [89]. Это особенность гелеобразования в частично замороженных многокомпонентных растворах, где часть компонентов реакционной смеси вытесняется из формирующихся кристаллов растворителя и попадает в незамерзшие микроканалы, в ограниченном пространстве которых в последствии проходит полимеризация мономеров или сшивка полимеров. Благодаря эффекту криоконцентрирования ускоряются химические реакции, и становится возможным формирование сшивок в растворах с низкой концентрацией компонентов, в которых при комнатной температуре сшивки не происходит.

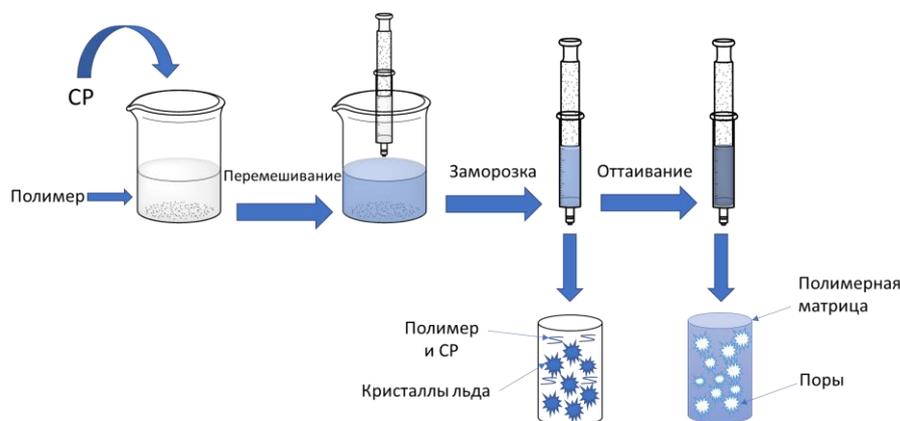


Рисунок 4 – Схема получения криогеля из раствора полимера (СР – сшивающий реагент)

Переход от режима гелеобразования к режиму криогелирования происходит за счет криоконцентрирования компонентов до начала реакции гелеобразования. В случае, если замораживание раствора и образование кристаллов растворителя происходит уже после точки гелеобразования, правильная пористая структура не

формируется, а лиофилизация уже сформированного геля не приводит к получению материалов, аналогичных по свойствам криогелям. Это хорошо видно из представленного ниже примера получения пористых материалов на основе фиброина шелка двумя разными способами. Типичные изображения набухших и лиофилизованных образцов гидрогеля и криогеля фиброина шелка, сшитых ДЭЭГ, представлены на рисунке 5. Гели и криогели фиброина шелка получали из растворов одного состава, но криогель был получен сшивкой при  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а гидрогель – при  $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$  [90]. После лиофилизации только криогель сохранял свою первоначальную форму и однородность структуры, что хорошо видно на фото поперечного сечения. СЭМ-изображения этих образцов (рисунок 5) также доказывают, что цилиндрическая форма гидрогелевой матрицы после лиофилизации деформирована, а пористая структура неоднородна. Механически стабильная и однородная матрица криогеля, напротив, характеризуется упорядоченной структурой взаимосвязанных пор, разделенных толстыми стенками.



Рисунок 5 – Фотоизображения внешнего вида в набухшем и сухом состояниях и СЭМ-изображения структуры образцов криогеля (верхний ряд) и гидрогеля (нижний ряд) фиброина шелка, сшитых ДЭЭГ при  $-18$  и  $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$  соответственно [90]

Известно, что свойства и морфология криогелей зависят от температуры гелеобразования, природы используемого растворителя, концентрации

гелеобразующих компонентов, присутствия других растворенных веществ, скорости замораживания и оттаивания, режима замораживания, продолжительности выдержки в замороженном состоянии и некоторых других факторов [91,92]. В таблице 1 представлены примеры того, как различные параметры получения криогелей влияют на их структуру и свойства. Размер пор, толщина и плотность стенок являются ключевыми параметрами, влияющими на характеристики криогеля. Размер пор значительно влияет на гидродинамические свойства криогелей (проницаемость для потока жидкости), а толщина и плотность стенок определяют их макроскопические механические свойства [93].

Таблица 1 – Параметры, регулируемые в процессе криотропного гелеобразования, и их влияние на свойства криогелей

Параметр	Эффект	Ссылка
Молекулярная масса полимера	Использование растворов полимеров с более низкой молекулярной массой приводит к получению криогелей с более крупными порами по сравнению с растворами полимеров с более высокой молекулярной массой.	[94]
Степень и тип сшивки	Увеличение степени сшивки приводит к снижению степени набухания криогелей и повышению их жесткости (модуль Юнга) и прочности. При физической сшивке обычно образуются криогели с небольшими размерами пор (< 100 мкм).	[71]
Температура криогелирования	Снижение температуры криогелирования приводит к уменьшению размеров пор и толщины их стенок.	[95–97]
Скорость охлаждения	Если скорость сшивки значительно меньше, чем скорость кристаллизации растворителя, формируются криогели с большим размером пор.	[98]
Степень ионизации функциональных групп	Увеличение степени ионизации функциональных групп полимера приводит к уменьшению размера пор криогеля.	[99]

Поскольку метод криогелирования предъявляет к сшивающим реагентам дополнительные требования, из достаточно широкого списка сшивающих

реагентов, рассмотренных в разделе 1.1, полностью удовлетворяет требованиям для сшивки хитозана в частично замороженных растворах только ГА. ГА достаточно реакционноспособен при отрицательных температурах и  $\text{pH} < 5.5$ , при котором хитозан полностью растворим.

Никоноров и др. [95] исследовали свойства и морфологию криогелей хитозана, сшитых ГА при разных температурах ( $-10$ ,  $-15$ ,  $-25$  и  $-30$  °C) и мольных соотношениях ХТЗ : ГА ( 2.5:1, 5:1, 10:1, 15:1, 20:1 и 25:1). При фиксированном мольном соотношении ХТЗ : ГА 5:1 криогели с порами наименьшего сечения (44.3 мкм) были получены при самой низкой температуре ( $-30$  °C), а с самыми крупными (72.3 мкм) – при  $-15$  °C, а не при самой высокой в ряду температуре  $-10$  °C, как можно было ожидать. Зависимость выхода гель-фракции, степени набухания и проницаемости криогелей от температуры практически во всех случаях имеет форму колокола, проходя через максимум [91], что обусловлено эффектами переохлаждения раствора при температуре ниже нуля. Так, переохлаждение в системе раствор хитозана/ГА при температуре  $-10$  °C приводит к образованию кристаллов льда меньшего размера, чем при температуре  $-15$  °C. Размер пор криогелей хитозана коррелировал с их проницаемостью, в данном случае с максимальной скоростью потока жидкости, протекающей через образец при давлении на него столба жидкости высотой 1 м.

Таким образом, температура замораживания и время роста кристаллов льда являются одними из наиболее эффективных инструментов управления структурой пор и гидродинамическими характеристиками криогелей без кардинального изменения их состава. В работе [96] предложен метод получения криогелей хитозана с регулируемым размером пор путем жесткого контроля температурных условий на каждой из пяти стадий получения из реакционной смеси ХТЗ (2 %) и ГА (1 %): 1) предварительное охлаждение при  $-6$  °C в течение 5 мин; 2) предварительная кристаллизация при  $-20$  °C в течение 80 с; 3) рост кристаллов (температуру варьировали от  $-1.5$  до  $-20$  °C, а время выдержки – от 30 мин до 24

ч); 5) замораживание при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч и оттаивание. Стадия роста кристаллов была ключевым этапом, определяющим морфологию криогеля. Более высокая температура и более длительное время роста кристаллов приводили к образованию более крупных пор. Когда время роста кристаллов было постоянным (30 мин), диаметр пор увеличивался с увеличением температуры заморозки, поры диаметром 60 мкм получены при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а с диаметром 135 мкм – при  $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . При постоянной температуре ( $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и времени роста кристаллов 24 ч диаметр пор криогеля составил 235 мкм. Таким образом, тонкая настройка температуры и времени роста кристаллов позволила получить криогели хитозана с диапазоном размеров пор от 60 до 235 мкм и проницаемостью, отличающейся в 2.5 раза.

Сшивка хитозана, как и любая реакция, сопровождающаяся увеличением молекулярной массы полимера, приводит к росту вязкости системы [94]. В работе [96] установлено, что в растворах хитозанов с молекулярной массой 190, 467 и 600 кДа в интервале температур от  $-30$  до  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  с наибольшей эффективностью криогелирование в результате сшивки ГА проходило в растворах хитозана с наименьшей длиной цепи, что объясняется меньшей вязкостью реакционной среды и как следствие, высокой подвижностью реагентов.

Очевидно, что и количество сшивающего реагента также будет влиять на распределение пор по размерам в структуре криогеля. Так, криогели хитозана, сшитые ГА при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  путем комбинации методов криогелирования и выщелачивания порогенов, описаны в работе [14]. Сшивку хитозана проводили в присутствии частиц ПММА для получения пористой структуры с более рыхлыми стенками макропор. Массовое количество ГА варьировали от 2.5 до 7 % при фиксированных остальных параметрах: концентрация раствора хитозана – 2 %, массовое соотношение ХТЗ:ПММА 1:4, время замораживания – 24 ч.

Как и ожидалось, при максимальной концентрации сшивающего реагента были получены криогели с минимальным размером пор до 90 мкм (рисунок 6).

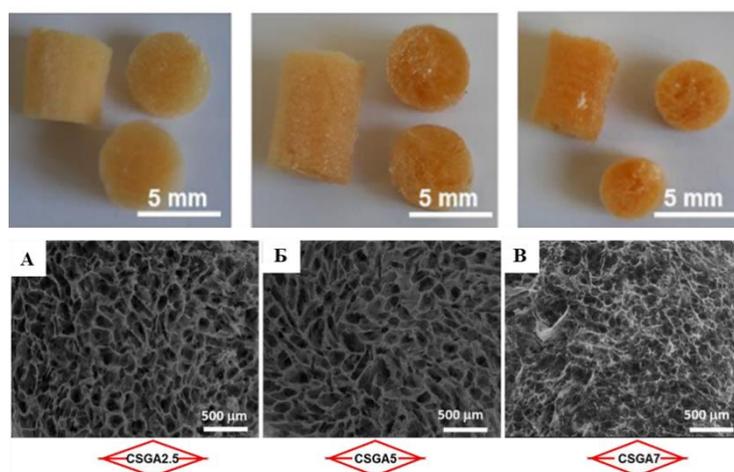


Рисунок 6 – Фотоизображения внешнего вида (верхний ряд) и СЭМ-изображения (нижний ряд) структуры криогелей хитозана, полученных при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  из 2 %-ного раствора хитозана сшивкой ГА при концентрации 2.5 % (А), 5 % (Б) и 7 % (В) [14]

Модуль Юнга (жесткость) и прочность криогелей увеличивались с увеличением содержания сшивающего реагента (рисунок 7).

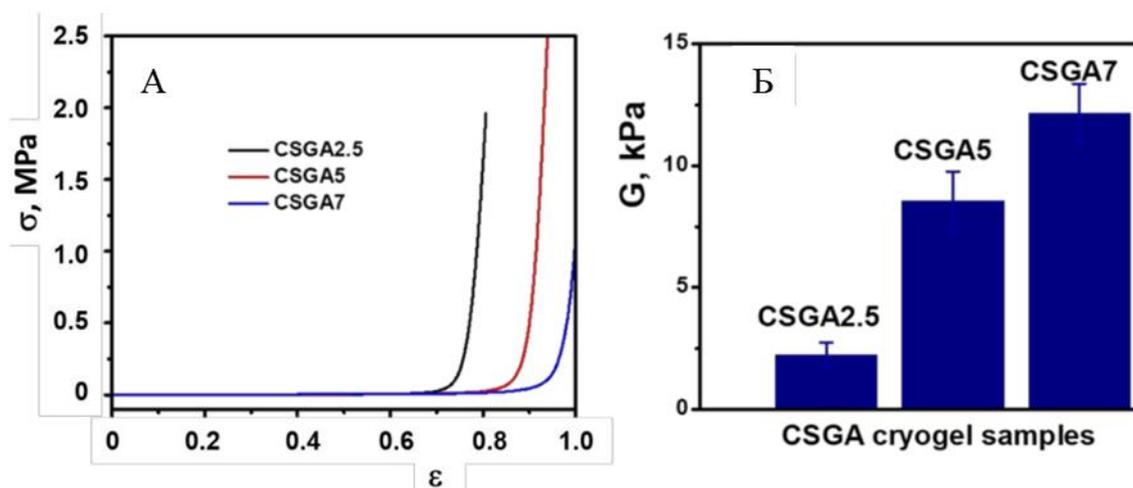


Рисунок 7 – Деформационные кривые (А) и модули Юнга (Б) набухших криогелей хитозана, полученных при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  из 2 %-ного раствора хитозана при концентрации ГА 2.5 % (CSGA2.5), 5 % (CSGA5) и 7 % (CSGA7) [14]

Криогели, полученные из 2.5 %-ных растворов хитозана при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  комбинацией методов криогелирования, разделения фаз и сшивки при

разных концентрациях ГА (0.25, 0.375 и 0.5 %), имели иерархическую пористую структуру [100]. Для разделения фаз использовали растворитель н-бутанол. При концентрации ГА 0.25 % бимодальная пористая структура с размерами пор 25–50 мкм и 4–10 мкм формировалась в результате криогелирования и разделения фаз соответственно (рисунок 8А-1). Контрольный криогель, полученный без использования н-бутанола, имел однородную пористую структуру с диаметром пор около 75 мкм (рисунок 8А-2), что подтверждает возможность регулирования пористой структуры путём комбинирования методов порообразования. Механические свойства полученных криогелей можно настраивать, варьируя концентрацию сшивающего реагента. Так, увеличение концентрации ГА с 0.25 до 0.5 % привело к увеличению модуля Юнга криогелей с 18.25 до 25.26 кПа (рисунок 8Б).

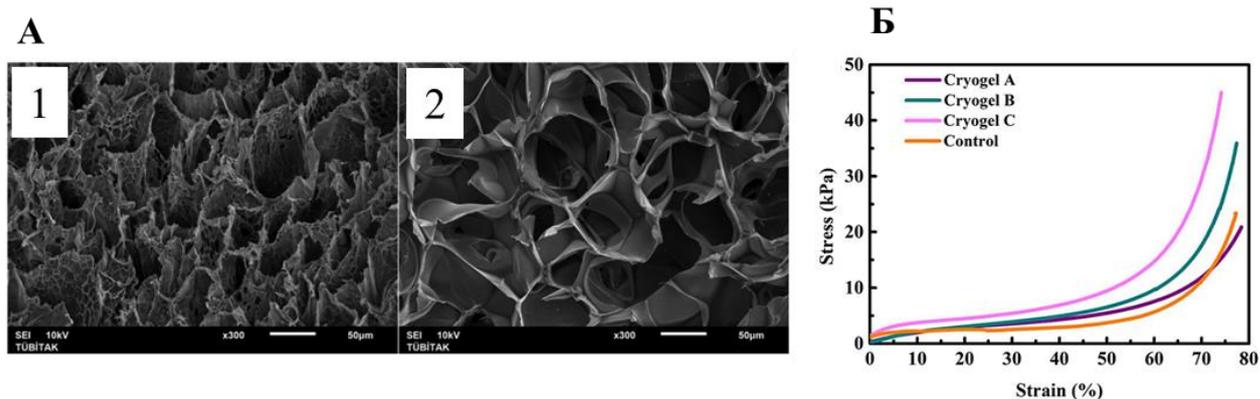


Рисунок 8 – СЭМ-изображения (А) структуры криогелей хитозана, сшитых при концентрации ГА 0.25 % в присутствии н-бутанола (1) и без него (2); деформационные кривые (Б), записанные при одноосном сжатии криогелей хитозана, сшитых в присутствии н-бутанола при концентрации ГА 0.25 % (Cryogel A), 0.375 % (Cryogel B), 0.5 % (Cryogel C) и без н-бутанола при концентрации ГА 0.25 % (Control) [100]

Проблема низкой эффективности сшивки хитозана ДЭ в кислой среде для получения пористых материалов была частично решена с помощью трудоёмкого многоэтапного подхода, включающего замену воды в замороженных растворах хитозана ацетоном при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , сушку и сшивку сухих криоструктуратов ДЭПЭГ в

щелочной среде при +60 °С [1]. Однако, полученные материалы нельзя считать криогелями, так как сшивка происходила уже после формирования пористой структуры.

### **1.3 Применение криогелей хитозана**

#### ***1.3.1 Сорбенты на основе криогелей хитозана***

Одной из важнейших областей применения хитозана и его производных является очистка вод от различных типов поллютантов, включая ионы тяжелых металлов и красители. Благодаря тому, что хитозан является одним из наиболее эффективных комплексообразователей в ряду природных полимеров, потенциал его применения для извлечения ионов металлов из природных и сточных вод широко обсуждается в литературе. В обзоре [38] детально рассмотрены кинетические и термодинамические аспекты сорбции ионов металлов хитозаном и хитин/хитозан-содержащей биомассой, проведен анализ влияния таких факторов как источник происхождения, форма полимера (хлопья, гранулы, пленки, волокна, мембраны и т.п.), его физические свойства (плотность, пористость, площадь поверхности, степень кристалличности) и условия применения (рН, температура, скорость перемешивания в статических или скорость потока в динамических условиях) на эффективность сорбционного извлечения ионов металлов.

На основе хитозана разработан криогель, модифицированный оксидами меди и цинка, для высокоэффективного удаления мышьяка из питьевой воды [101]. Авторы отмечают, что за 2 ч контакта с криогелем степень извлечения мышьяка из водного раствора составила 76 %. Высокая эффективность сорбции и возможность регенерации полученного материала делают его потенциальным кандидатом для разработки недорогих фильтров для извлечения мышьяка.

Предложен способ получения композитного криогеля хитозана, сшитого ГА и модифицированного природным цеолитом (клиноптолитом), для извлечения

ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Cr}^{3+}$  из промышленных сточных вод с максимальной сорбционной емкостью 61.10, 18.67, 12.24, 53.46 и 0.85 мг/г соответственно [102]. Установлено влияние нескольких параметров (массы сорбента, времени контакта, pH, начальной концентрации ионов металлов и температуры) на эффективность извлечения ионов металлов. Оптимальные значения pH для эффективного извлечения ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Cr}^{3+}$  составили 5.0; 5.0; 4.5; 4 и 3.5 соответственно.

Для увеличения сорбционной ёмкости по отношению к ионам  $\text{Cu}^{2+}$  был разработан метод функционализации гранул криогеля хитозана, сшитого ГА, фрагментами этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) [103]. Сорбционная ёмкость криогеля хитозан-ЭДТА составила 168 мг/г, что в четыре раза выше по сравнению с ёмкостью немодифицированного криогеля.

Композитные широкопористые криогели поливиниловый спирт(ПВС)/хитозан, содержащие до 6 % хитозана, были испытаны в качестве сорбентов для извлечения ионов  $\text{Cu}^{2+}$  [104]. Максимальная сорбционная ёмкость составила всего 0.12 ммоль/г (7.88 мг/г), что значительно ниже, чем для большинства описанных в литературе сорбентов из-за низкого массового содержания активного компонента (хитозана) в матрице (ПВС), не обладающей сорбционными свойствами, но обеспечивающей улучшение кинетики сорбции за счёт пористой структуры. Примеры получения монолитных сорбентов для применения в сорбционных колонках на основе хитозана без вспомогательных полимеров немногочислены, но, тем не менее, представлены в литературе [93].

Для повышения сорбционной ёмкости хитозана и расширения спектра элементов, которые могут быть извлечены из растворов, криогели хитозана, сшитые ГА при соотношении  $\text{ГА}/\text{NH}_2$  0.02 моль/моль, были модифицированы пиридоксаль-5'-фосфатом (ПФ), а их сорбционные свойства исследованы по отношению к ионам  $\text{Cu}^{2+}$  и уранил-ионам [2]. Сорбцию ионов  $\text{Cu}^{2+}$  исследовали только в статических условиях из растворов  $\text{CuSO}_4$  в диапазоне концентраций

0.005-0.1 моль/л. После обработки криогеля хитозана, модифицированного ПФ, раствором  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  для восстановления иминных связей, сорбционная емкость материала по отношению к ионам  $\text{Cu}^{2+}$  увеличилась с 3 ммоль/г до 4.1 ммоль/г. Сорбцию уранил-ионов исследовали в статическом и динамическом режимах на модельных растворах  $\text{UO}_2\text{SO}_4$  в диапазоне концентраций от  $1.2 \cdot 10^{-6}$  до  $3.7 \cdot 10^{-3}$  моль/л. Статическая сорбционная емкость криогеля хитозана, модифицированного ПФ, составила 2.1 моль/г, что более чем в 10 раз выше емкости немодифицированного криогеля. При пропускании раствора  $\text{UO}_2\text{SO}_4$  с концентрацией  $4.2 \cdot 10^{-6}$  моль/л при pH 5.0 через колонку с монолитным криогелем (объем 1 мл) пропуск уранил-ионов наблюдали через 2 и 140 колоночных объемов для исходного и модифицированного криогелей соответственно.

Селективные по отношению к ионам  $\text{Cu}^{2+}$  криокомпози́ты на основе хитозана были получены комбинацией методов криогелирования и ионного импринтинга [106]. Одновременно проводили сшивку комплексов  $\text{Cu}^{2+}/\text{ХТЗ}$  глутаровым альдегидом и полимеризацию акриламида в присутствии  $\text{N,N}'$ -метиленабисакриламида. Установлены оптимальные концентрации акриламида (15 массовых %) и хитозана (2 массовых %), при которых были получены материалы, имеющие трубчатую пористую структуру со связными параллельными микроканалами, расстояние между стенками которых составило  $25 \pm 2$  мкм. Сорбцию ионов  $\text{Cu}^{2+}$  на криокомпози́тах осуществляли при pH 4.5 из водных двухкомпонентных растворов, содержащих мешающие ионы  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  или  $\text{Pb}^{2+}$  в концентрации 200 мг/л. Максимальная сорбционная ёмкость композита по ионам  $\text{Cu}^{2+}$ , рассчитанная с применением модели Ленгмюра, составила 260 мг/г.

Сорбционные свойства криогелей хитозана, сшитых ГА, по отношению к пестициду Fastac 10ЕС исследовали в нескольких последовательных циклах адсорбции/десорбции [14], варьируя pH от 3 до 10 ед., время контакта от 1 до 48 ч и начальную концентрацию поллютанта в диапазоне 0.09–0.36 мг/л. Максимальная сорбционная ёмкость материала при оптимальных условиях составила 160.82 мг/г.

В работе [105] продемонстрировано эффективное извлечение наночастиц серебра с использованием криогеля хитозана, сшитого ГА (рисунок 9). Криогель был получен при температуре  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  из 1.4 %-ного раствора хитозана при концентрации ГА 0.25 %. Сорбционная ёмкость криогеля составила 63 мг/г при концентрации серебра в исходном раствора 14 мг/л и скорости потока 0.8 мл/мин, что позволяет очистить одним граммом сорбента около 4.5 л воды с эффективностью 96.5 %.

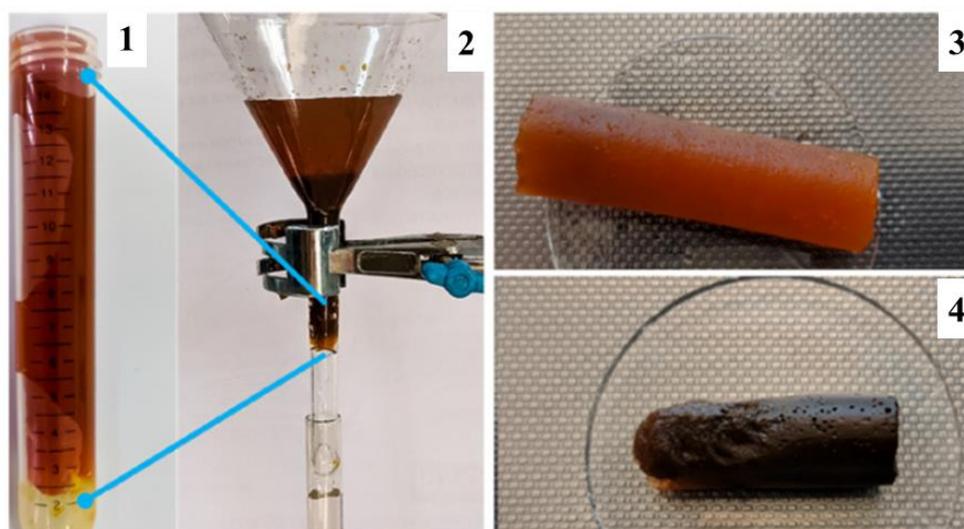


Рисунок 9 – Лабораторная установка для извлечения наночастиц серебра криогелем (1,2); фотоизображения криогеля до (3) и после (4) сорбции наночастиц серебра [105]

Применение для сшивки хитозана ГА в концентрациях, необходимых для обеспечения достаточной прочности криогелей, приводит к значительному снижению содержания свободных аминогрупп и, соответственно, сорбционной активности хитозана. Для решения этой проблемы Драган с соавторами [107] разработали криогели хитозан/полиэтиленимин (ПЭИ) со структурой взаимопроникающих сеток, первая из которых формируется хитозаном, сшитым ГА при мольных соотношениях хитозан:ГА 20:1 и 5:1, а вторая – ПЭИ, сшитым ДЭЭГ при мольном соотношении ПЭИ:ДЭЭГ 20:1. Максимальная сорбционная ёмкость по фосфат-ионам в ряду полученных материалов составила 343 мг/г и была

достигнута при использовании криогеля с содержанием ПЭИ 15 % при максимальной степени сшивки хитозана ГА.

Композитный криогель на основе хитозана и желатина был получен сшивкой ГА для адсорбции красителя PR MX-5B из водных растворов [108]. Криогель с равновесной степенью набухания  $6382 \pm 40$  %, достигаемой за 160 мин контакта с водой, характеризовался открытой пористой структурой с размером пор от 20 до 100 мкм. Максимальная сорбционная ёмкость криогеля по отношению к красителю PR MX-5B при сорбции из раствора с содержанием 50 мг/л составила 64.56 мг/г при pH 3.0.

### ***1.3.2 Криогели как носители катализаторов***

В последнее десятилетие использование мягких носителей катализаторов – гидрогелей и криогелей различных функциональных полимеров привлекает большое внимание в связи с их ожидаемой или доказанной высокой каталитической активностью [109]. Интерес к использованию хитозана и его производных в качестве носителей катализаторов определяется несколькими факторами. Прежде всего, высокая сорбционная ёмкость по отношению к ионам благородных и переходных металлов [110] позволяет контролировать их загрузку и получать наночастицы металлов *in situ* путем восстановления предварительно адсорбированных ионов металлов. Благодаря сильным взаимодействиям между поверхностью наночастиц металлов и функциональными группами полимерного носителя такой подход дает более стабильные композитные катализаторы по сравнению с теми, которые получают методом пропитки [111]. В обзоре [112] рассматриваются различные методы синтеза (нано)катализаторов на основе природных полисахаридов, в том числе хитозана. Показано, что полученные материалы могут служить перспективными катализаторами в реакциях окисления как при синтезе новых соединений, так и в процессах деградации загрязняющих

веществ, демонстрируя значительную производительность по сравнению с обычными (нано)катализаторами.

Способность хитозана координировать кластеры оксидов ванадия, вольфрама и молибдена и контролировать их рост позволила получить органо-неорганические гибридные микросферы (рисунок 10А) [113]. Пористые материалы были получены путем гелеобразования хитозана в щелочном растворе, заменой растворителя этанол/вода с возрастающей концентрацией этанола (10, 30, 50, 70, 90, 100 %) и сушкой в сверхкритических условиях (73.8 бар, 31.5 °С). Благодаря открытой сетчатой структуре микросфер (рисунок 10Б), редокс активные катализаторы проявляли высокую эффективность и селективность в реакции окисления цинамилового спирта в воздушной атмосфере при нормальных условиях.

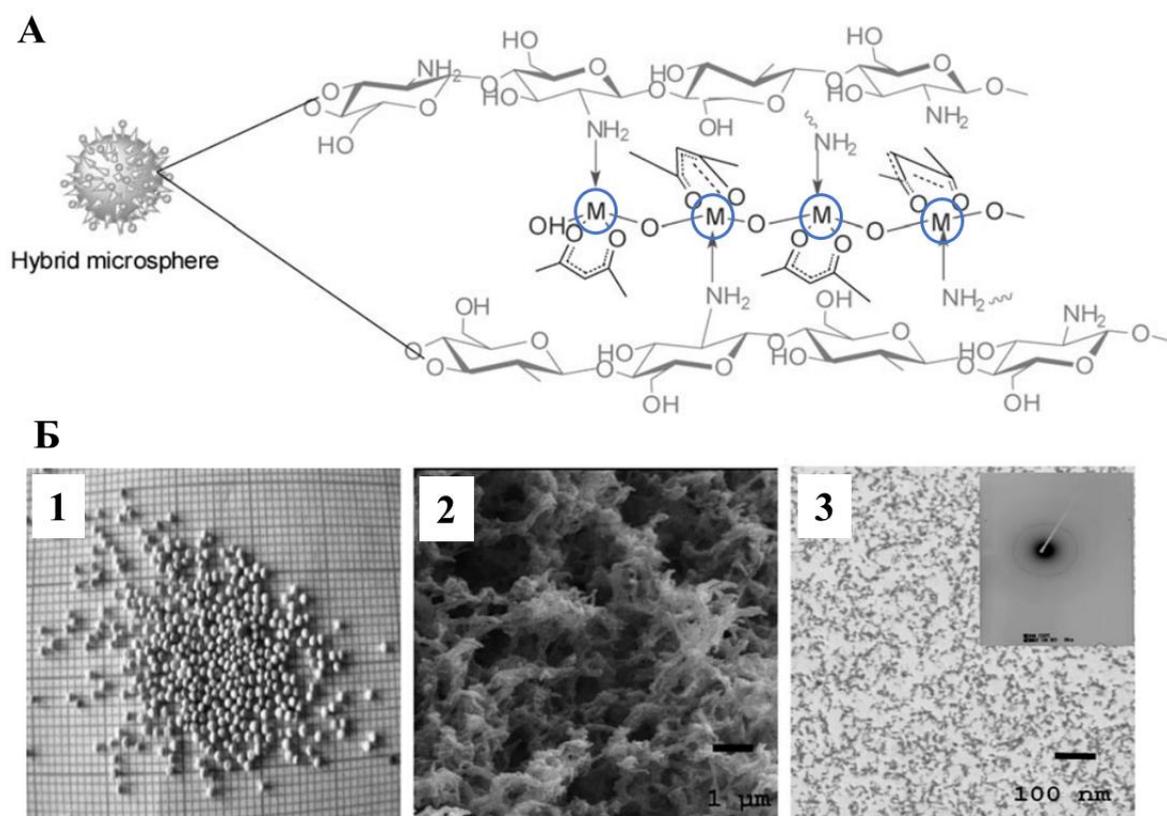


Рисунок 10 – Предполагаемая структура органо-неорганических гибридных микросфер, где М – ванадий, вольфрам или молибден (А); фотоизображение (1), СЭМ-изображение (2) и ТЭМ-изображение с дифракционной картиной (3) микросфер хитозан-оксид ванадия (Б) [113]

Разработан простой метод получения криогелей хитозана, содержащих наночастицы золота. В 1 %-ный раствор полисахарида при быстром перемешивании добавляли разные количества раствора  $\text{H}[\text{AuCl}_4]$  до достижения конечных концентраций золота 0.5, 1.0, 2.0 и 4.0 мМ. Затем растворы выдерживали в морозильной камере при  $-12\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 18 ч, полученные криогели хитозана с содержанием золота 98.5, 196.9, 393.9 и 787.8 мкг/кг обрабатывали 5 %-ным раствором 1,1,3,3-тетраметоксипропана (ТМП) для восстановления и стабилизации наночастиц (рисунок 11А). Преимуществом полученных материалов является равномерное распределение наночастиц и отсутствие агрегатов (рисунок 11Б).

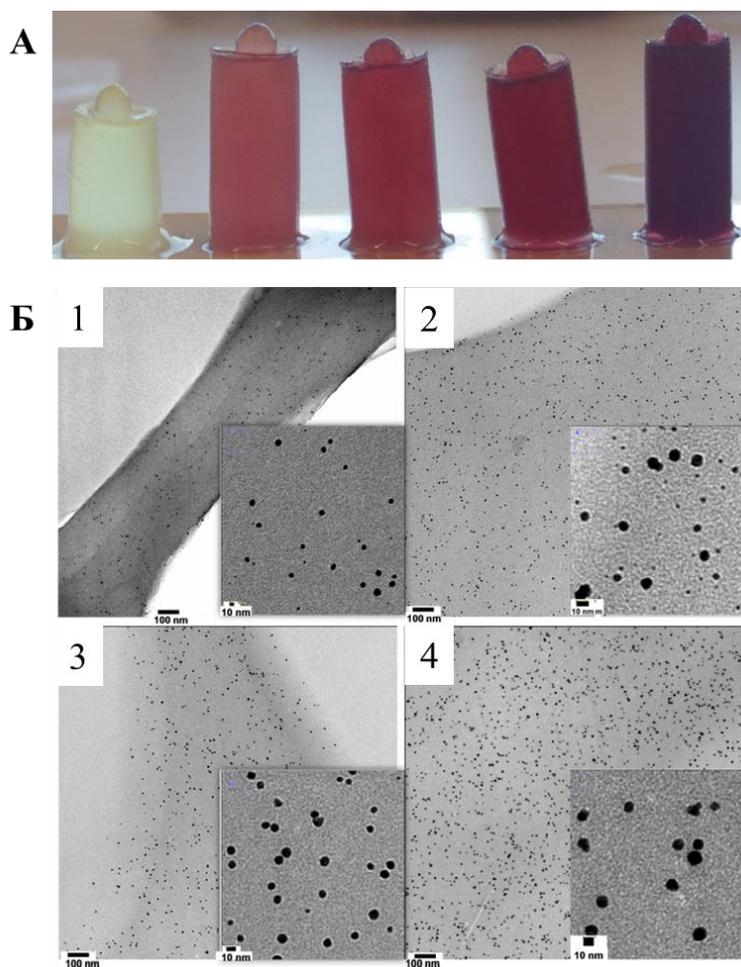


Рисунок 11 – Фотоизображение криогелей (слева направо) без золота и с золотом 98.5, 196.9, 393.9 и 787.8 мкг/кг соответственно (А). ПЭМ-изображения криогелей, содержащих (1) 98.5, (2) 196.9 (3) 393.9 и (4) 787.8 мкг/кг золота (Б) [114]

Каталитическая активность полученных материалов была изучена на примере модельной реакции восстановления 4-нитрофенола (4-НФ). Степень превращения 4-НФ в 4-аминофенол для криогеля с наименьшим содержанием наночастиц золота 98.5 мкг/кг достигала 96.8 % при комнатной температуре. Активность катализатора не снижалась в течение четырнадцати последовательных циклов тестирования. Такой тип катализаторов может быть использован для очистки сточных вод и проведения других каталитических процессов в мягких условиях.

Похожий подход был использован для получения криогелей хитозана, содержащих наночастицы платины и палладия [115]. В 1%-ный уксуснокислый раствор хитозана при быстром перемешивании добавляли растворы  $\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$ ,  $\text{K}_2[\text{PtBr}_4]$  или  $\text{Na}_2[\text{PtCl}_4]$ . Реакционные смеси быстро переносили в стеклянную пробирку (диаметром 7 мм) и замораживали при  $-12\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Полученные материалы, содержащие 0.05, 0.2 или 0.4 мМ  $[\text{PdCl}_4]^{2-}$  или 1.0, 2.0 или 4.0 мМ  $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ , после оттаивания при комнатной температуре обрабатывали 2.5 %-ным раствором ГА, который одновременно выступал как сшивающий агент и восстановитель. Степень конверсии 4-НФ при комнатной температуре в присутствии наночастиц палладия на криогеле из расчета 3 мкг/мл в 5 мМ растворе 4-НФ составила 98.9 %.

### ***1.3.3 Биомедицинское применение криогелей хитозана***

Высокий интерес к применению материалов на основе хитозана и его производных в биомедицине определяется их структурным сходством с гликозаминогликанами и, таким образом, с внеклеточным матриксом [116], а также хорошими кровоостанавливающими [117], проангиогенными [69] и антимикробными свойствами [118–120].

### **1.3.3.1 Устойчивость хитозана и материалов на его основе к ферментативному гидролизу**

Биомедицинское применение пористых материалов предполагает возможность настраивать их механические свойства для имитации свойств ткани организма, которую замещает имплантат, и биорезорбироваться со скоростью, близкой к скорости замещения имплантата клетками [25] или необходимой для поддержания определенной концентрации высвобождаемого лекарственного препарата в случае адресной доставки [93,121].

Хитозан разлагается ферментами, присутствующими в организме человека, что во многом определяет высокий интерес к нему для получения биорезорбируемых материалов различного назначения [72]. Наиболее широко применяется в исследованиях *in vitro* для оценки скорости ферментативной деградации хитозана фермент лизоцим, присутствующий во многих тканях и жидкостях человеческого организма. Лизоцим относится к ферментам класса гидролаз и участвует в расщеплении  $\beta$ -(1-4) гликозидной связи между двумя N-ацетил-D-глюкозаминными остатками. В исследованиях Фрейера [122] по ферментативному разложению пленок хитозана с разной степенью дезацетилирования (СД) установлено, что гексасахаридная последовательность, состоящая из 3–4 ацетилированных единиц, вносит основной вклад в процессы гидролиза гликозидной связи между сахарными остатками последовательности цепи биополимера. За 28 дней полностью разложились пленки хитозана со СД, лежащей в диапазоне от 41.0 до 59.3 %. Материалы, полученные из хитозана со значениями СД выше или ниже указанного диапазона, разлагались намного хуже. Автор предполагал, что отсутствие нужных последовательностей мономеров по длине полимерной цепи является причиной медленной деградации образцов с очень низкими и высокими значениями СД.

К настоящему времени опубликовано довольно много работ [123–128] по ферментативному разложению лизоцимом хитозановых и

карбоксилкилхитозановых криогелей. Потеря массы в течение нескольких недель ферментативной деградации обычно не превышает 20 %. Хотя степень деацетилирования хитозана и его кристалличность являются ключевыми параметрами, влияющими на скорость его ферментативной деградации [129], химическая модификация по аминогруппе может изменить характер распределения мономеров, а значит, и устойчивость к гидролизу, вследствие того, что ферменты распознают определенную последовательность мономерных звеньев [130]. Снижение количества структурных фрагментов, доступных для ферментативной атаки, приводит к более низкой скорости деградации [70,131]. Более высокая плотность сшивки также приводит к снижению доступности центров для ферментативной атаки из-за диффузионных ограничений и, соответственно, к снижению скорости ферментативной деградации [132].

В немногочисленных известных к настоящему времени исследованиях ферментативной деградации хитозана и других полисахаридов, сшитых ДЭ, были получены противоречивые данные. Так, несмотря на предположение о сшивке пленок хитозана ДЭБД через аминогруппы при мольном избытке ДЭ, разница в глубине гидролиза хитозаназой за 24 ч между сшитыми и несшитыми пленками была незначительной [70]. Скорость деградации пленок хитозана, полученных из уксуснокислых растворов сшивкой ДЭПЭГ, была выше, чем нейтрализованных несшитых пленок, что авторы связали с повышением гидрофильности пленок с увеличением содержания ПЭГ [133], хотя ожидалось, что сшивка ДЭ в кислой среде уменьшит количество доступных аминогрупп и, следовательно, восприимчивость к ферментативному гидролизу [134]. Сшивка карбоксиметилцеллюлозы в щелочной среде ДЭПЭГ через гидроксильные группы, напротив, снижала скорость разложения и деградацию целлюлазой, при этом не было обнаружено никакой корреляции между способностью к деградации и набуханием [135].

Систематические исследования влияния длины ДЭ и плотности сшивки на устойчивость ковалентно сшитого хитозана к ферментативной деградации до настоящего времени не проводились.

### ***1.3.3.2 Криогели для культивирования клеток***

3D полимерные скаффолды, обеспечивающие механическую поддержку клеток при культивировании и имитирующие *in vitro* характеристики внеклеточного матрикса *in vivo*, широко востребованы в клеточных технологиях. По сравнению с двухмерными (2D) моделями, 3D клеточные модели лучше передают физиологические особенности клеточных культур и демонстрируют большой потенциал для разработки более адекватных моделей опухолей для изучения гипоксии, агрегации, кластеризации, миграции и пролиферации клеток [136], а также устойчивости опухолей к действию химиопрепаратов [137]. Так, было показано, что клетки НСТ 116 (клетки карциномы прямой кишки человека) в опухолевых сфероидедах в 1.5–3.5 раза менее чувствительны к некоторым противоопухолевым препаратам, чем те же клетки, культивируемые в 2D условиях [138]. Организация актиновых филаментов в клетках карциномы печени человека при 3D культивировании иная, чем у клеток, выращенных в монослое на поверхности культуральной посуды [139].

Перспективными трехмерными клеточными структурами, наиболее приближенными к реальным опухолевым тканям, являются многоклеточные опухолевые сфероиды, выращенные в полимерных матрицах. Недостатками непористых гелевых матриц является формирование барьера для диффузии кислорода и питательных веществ в объем геля [140]. Успешное культивирование опухолевых клеток и со-культивирование их с клетками нормальных тканей требует жёсткого контроля таких параметров скаффолдов, как пористость, химия поверхности, механические свойства и др.

Недостатком материалов на основе синтетических полимеров является их низкая способность вызывать клеточные реакции [141], в результате чего для повышения адгезии и пролиферации клеток необходима модификация поверхности клеточными адгезивами, например, RGD-пептидом [138]. Использование коллагена и желатина в настоящее время вызывает критику из-за значительного влияния факторов роста и сигнальных молекул на пролиферацию и клеточные отклики при воздействии тестируемых химических веществ. Кроме того, состав и характеристики белковых матриц сильно варьируют от партии к партии [142].

Известно, что жесткость субстрата значительно влияет на пролиферацию, миграцию, выживание и инвазивность опухолевых клеток [143]. Авторы работы [144] установили, что отклик на жесткость субстрата зависит от фенотипа клеток: некоторые клетки лучше мигрируют и пролиферируют в мягких гелях, в то время как другие предпочитают более жесткий матрикс. Например, клетки рака прямой кишки и молочной железы демонстрировали более быструю миграцию при увеличении жесткости субстрата [145]. Гидрогели на основе белка (коллаген, Matrigel®, желатин) обладают высокой биосовместимостью и адгезивностью по отношению к клеткам, но помимо контаминации веществами животного происхождения, имеют ограниченный диапазон модулей Юнга, как правило от 0.1 до 4 кПа, в то время как ткани солидных опухолей могут иметь модуль Юнга выше 60 кПа [146]. Для повышения жесткости белковых гелей часто используют комбинации различных белков, например коллаген I типа и желатин [147], Matrigel® и коллаген I типа [148]. Использование лизилоксидазы в качестве сшивающего реагента повышает жесткость коллагенового матрикса до 15 кПа и обеспечивает получение более физиологически релевантного матрикса [149]. Для увеличения жесткости белковых матриц используют также модификацию метакрилатными группами, обеспечивающими возможность фотоинициируемой

сшивки. Так, на основе желатина были получены биосовместимые гидрогели с модулем Юнга до 10 кПа [150].

Благодаря широкому диапазону жесткости, достигаемому за счет использования широкого спектра сшивающих реагентов и варьирования степени сшивки, гидрогели на основе полисахаридов (альгинат, хитозан, пектин, гиалуронат и т.д.) являются привлекательной альтернативой системам на основе коллагена и желатина для выращивания опухолевых сфероидов.

## ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Материалы

В работе использовали хитозан (ХТЗ) производства компании BioLog Herre GmbH (Германия) со степенью дезацетилирования (СД) 0.9 по данным ЯМР  $^1\text{H}$  спектроскопии и средней вискозиметрической молекулярной массой 30 кДа (данные производителя).

Сшивающие реагенты (СР) – диглицидиловый эфир поли (этиленгликоля) со средней молекулярной массой 500 (ДЭПЭГ), диглицидиловый эфир 1.4-бутандиола (ДЭБД), глутаровый альдегид (ГА), краситель ализариновый красный S (АК) приобретены у Sigma-Aldrich (США), диглицидиловый эфир этиленгликоля (ДЭЭГ) приобретён у J & K Scientific (Китай). Жидкий ферментный препарат  $\beta$  - глюканаза с активностью 10 000 ед./мл, полученный путем культивирования селекционированного штамма гриба *Miceliophthora fergusii* с последующей очисткой и концентрированием, приобретен в ООО «Биопрепарат» (Россия).

Все остальные реагенты имели квалификацию не ниже ч.д.а. Для приготовления растворов использовалась деионизированная вода с удельным сопротивлением 18.2 МОм·см.

### 2.2 Приготовление растворов хитозана

3 %-ные растворы хитозана готовили путем растворения навески полимера в растворах соляной или уксусной кислот при мольном отношении кислоты к аминогруппе, равном 1. Для определения времени гелеобразования в зависимости от длины цепи ДЭ при температуре +25 °С (раздел 2.3 и 3.1) и получения гелей и криогелей, свойства которых обсуждаются в главе 3, рН растворов доводили до рН 5.5 с использованием 1 М растворов соляной или уксусной кислот. Для исследования времени гелеобразования при температуре +25 °С в зависимости от

pH 3 %-ные солянокислые растворы хитозана доводили до pH 3.5; 4.0; 4.5; 5.0 и 5.5 ед. с использованием 1 М раствора соляной кислоты.

Для получения криогелей хитозана, свойства которых обсуждаются в главе 4, 3%-ные солянокислые растворы хитозана доводили до pH 5.5 с использованием 1 М раствора соляной кислоты.

### **2.3 Определение времени гелеобразования**

Предварительно рассчитанные количества сшивающих реагентов ДЭЭГ, ДЭБД, ДЭПЭГ, соответствующие мольным соотношениям ДЭ:ХТЗ 1:1 и 1:20, добавляли к растворам хитозана, приготовленным как описано в разделе 2.2, после перемешивания в течение 15 мин реакционные смеси оставляли для гелеобразования при температуре +25 °С. Реологические свойства реакционных смесей ДЭ:ХТЗ после добавления ДЭ исследовали в осцилляционном режиме в диапазоне частот от 0.2 до 400 Гц с использованием реометра Physica MCR 301 (Anton Paar GmbH, Австрия) с системой измерения плоскость-плоскость диаметром 25 мм при температуре +25 °С. Временные интервалы между измерениями выбирали в зависимости от скорости сшивки, измерения были прекращены через 7 дней после добавления сшивающего реагента. Точку гелеобразования ( $G' = G''$ ) определяли из зависимостей модулей накопления ( $G'$ ) и потерь ( $G''$ ) при частоте 11.2 Гц от времени.

### **2.4 Исследование гелеобразования при температуре +25 °С**

Реакционные смеси ДЭ:ХТЗ 1:1, полученные как описано в разделе 2.3, через 1, 3 и 7 дней после добавления ДЭ в раствор хитозана и дополнительно через 1 ч при сшивке ДЭПЭГ в уксуснокислом растворе замораживали при температуре – 10 °С в морозильной камере Liebherr (Германия) и сушили в сублимационной

сушке FD-1A-50 Shanghai Zhengqiao Scientific Instruments Co., Ltd. (Китай). Лиофилизированные через 7 суток после добавления ДЭ реакционные смеси делили пополам, одну часть промывали последовательно водным и водно-спиртовым раствором (20:80 об. %) для удаления непрореагировавших веществ и повторно лиофилизовали. Образцы обозначали как гидрогели ДЭ:ХТЗ (EtOH).

## 2.5 Получение криогелей хитозана

Для получения криогелей к 3%-ным солянокислым и уксуснокислым растворам хитозана с pH 5.5, приготовленным как описано в разделе 2.2, добавляли ДЭ в рассчитанных для заданных мольных соотношений ДЭ:ХТЗ (от 2:1 до 1:20) количествах, интенсивно перемешивали в течение 15 мин и помещали в пластиковые шприцы объемом 1 (внутренний диаметр 4.5 мм, высота слоя – 60 мм) или 2 мл (внутренний диаметр 8.5 мм, высота слоя – 30 мм), герметизировали и выдерживали в морозильной камере при  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 12 дней. Промывали дистиллированной водой (объемом не менее 200 мл) в проточном режиме с использованием перистальтического насоса Ismatec (Германия). Непроницаемые криогели извлекали из шприцов и промывали в 200 мл дистиллированной воды в течение 7 ч, обновляя воду каждый час. Криогели, сшитые ДЭЭГ, ДЭБД и ДЭПЭГ, были обозначены как ДЭЭГ:ХТЗ, ДЭБД:ХТЗ и ДЭПЭГ:ХТЗ соответственно с указанием мольного соотношения сшивающий реагент:полимер. Например, ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 обозначает криогель ХТЗ, сшитый ДЭЭГ при мольном соотношении ДЭЭГ:ХТЗ 1:4.

В предварительных экспериментах сшивку в системе ДЭЭГ:ХТЗ 1:1 в солянокислом растворе хитозана при pH 5.0 проводили при температуре  $-5$ ,  $-10$  и  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в шприцах объемом 1 мл, время сшивки варьировали от 6 до 12 суток и определяли проницаемость криогелей, как описано в разделе 2.6.2.

## 2.6 Характеризация криогелей хитозана

### 2.6.1 Элементный состав и ИК-Фурье спектроскопия

Массовые содержания углерода, азота, водорода в хитозане и криогелях определяли в трех параллельных измерениях с использованием анализатора Euro EA 3000 CHNS Eurovector (Италия). Степень модификации (СМ) криогеля сшивающим реагентом рассчитывали по следующей формуле (1):

$$CM = \frac{C/N_{\text{криогель}} - C/N_{\text{хитозан}}}{n}, \quad (1)$$

где  $C/N_{\text{криогель}}$  и  $C/N_{\text{хитозан}}$  – атомные отношения углерод/азот в криогелях и хитозане соответственно;  $n$  – количество атомов углерода в сшивающем реагенте.

Инфракрасные спектры с Фурье-преобразованием (ИК-Фурье) лиофилизированных реакционных смесей ДЭ:ХТЗ, гидрогелей ДЭ:ХТЗ (EtOH) и криогелей записывали с использованием спектрометра IR–Affinity–1 Shimadzu (Япония) с приставкой однократного нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) для малых образцов QATAR 10. Пробоподготовку осуществляли как описано в разделе 2.5. Перед снятием ИК-Фурье спектров навески образцов ~ 30 мг сжимали гидравлическим прессом СУ-РС-24 (Россия) при давлении 5 МПа в прессформе диаметром 10 мм.

### 2.6.2 Набухание, проницаемость и морфология криогелей

Общую степень набухания (ST) свежеприготовленных криогелей оценивали гравиметрически в два этапа. Сначала для определения вклада в набухание несвязанной с полимером воды (SW), то есть свободной воды, циркулирующей в каналах макропор, равновесно набухший в воде в течение 24 ч криогель сжимали вручную и взвешивали. Затем для определения общей степени набухания (ST) криогель сушили до постоянной массы.

Расчет общей степени набухания проводили по формуле (2):

$$ST = \frac{W}{W_t} \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где,  $W$  – масса воды в набухшем криогеле, определяемая по разнице массы криогеля в набухшем и сухом состоянии (для расчета полной степени набухания), г;  $W_t$  – масса равновесно набухшего криогеля, г.

Расчет степени набухания за счет макропор проводили по формуле (3):

$$SW = \frac{W_w}{W_t} \cdot 100 \%, \quad (3)$$

где,  $W_w$  – масса воды в криогеле, удаляемая при сжатии, г;  $W_t$  – масса равновесно набухшего криогеля, г.

Степень набухания полимерной фазы (SP) рассчитывали по разнице общей степени набухания (ST) и набухания за счет макропор (SW).

Проницаемость криогелей определяли как максимальную скорость потока воды, свободно проходящего через монолитный криогель, полученный в шприце. Скорость потока регулировали с помощью перистальтического насоса (Ismatec, Германия). Максимальной скоростью потока (проницаемостью) считали скорость, при превышении которой наблюдали либо выход криогеля через носик колонки, либо резкий рост сопротивления на колонке, препятствующий прохождению потока. Максимально возможная скорость потока с учетом параметров насоса составляла 450 мл/ч или 260 колоночных объемов в час (к.о./ч) для криогеля объемом 2 мл.

Морфологию равновесно набухших криогелей хитозана, предварительно окрашенных флуоресцеином, исследовали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss LSM 800 (Германия) с обычным 10-кратным и 20-кратным объективом. Возбуждение и детектирование сигнала проводили на длинах волн 488 и 530 нм соответственно. Распределение пор по размерам рассчитывали с использованием программного обеспечения ImageJ [151]. Для анализа пористой структуры образцы отбирали из середины шприцев, чтобы избежать эффектов разницы в условиях переохлаждения, которые часто приводят

к неоднородности пористой структуры в срезах криогеля из верхней, средней и нижней части формы [152].

### 2.6.3 Механические свойства криогелей

Механические свойства криогелей хитозана исследовали с использованием реометра Physica MCR 301 Anton Paar GmbH (Австрия) с системой измерения плоскость-плоскость диаметром 25 мм. Одноосное сжатие равновесно набухших криогелей хитозана цилиндрической формы диаметром 10–15 мм и высотой 8–10 мм проводили при постоянной скорости 0.01 мм/с: кривую «нагрузки» записывали до сжатия образца на 75 % по высоте, затем нагрузку снимали с той же скоростью и записывали кривую «разгрузки» до начальной точки.

Из измеренной нормальной силы ( $F_N$ ) и высоты образца ( $l$ ) рассчитывали напряжение ( $\sigma$ ) и деформацию ( $\varepsilon$ ) по формулам:

$$\sigma = \frac{F_N}{S}, \quad (4)$$

где  $\sigma$  – напряжение, Па;  $F_N$  – нормальная сила, Н;  $S$  – площадь материала, м<sup>2</sup>.

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} * 100\%, \quad (5)$$

где  $\varepsilon$  – деформация, %;  $l_0$  – начальная высота образца, м;  $\Delta l$  – изменение высоты образца, м.

Модуль Юнга ( $E$ ) рассчитывали по формуле (6) из линеаризованной зависимости нормальной силы ( $F_N$ ) от изменения высоты образца на участке для деформации от 0 до 15%:

$$E = \frac{l_0 \cdot F_N}{S \cdot \Delta l}, \quad (6)$$

где  $F_N$  – нормальная сила, Н;  $l_0$  – начальная высота образца, м;  $\Delta l$  – изменение высоты образца, м;  $S$  – площадь образца, м<sup>2</sup>.

Нагрузку ( $\sigma$ ) при сжатии до достижения деформации ( $\varepsilon$ ) по высоте на 40 и 75% ( $\sigma$ –40 и  $\sigma$ –75 соответственно) рассчитывали из кривой «нагрузки».

Удельную потенциальную энергию деформации ( $U$ ) рассчитывали по формуле (7) путём интегрирования площади под кривой «нагрузки» на деформационной кривой цикла одноосного сжатия при деформации образца до  $\varepsilon = 75\%$ .

$$U = \int_0^{\varepsilon} \sigma \cdot d(\varepsilon) \quad (7)$$

где  $U$  – удельная потенциальная энергия деформации, Дж/м<sup>3</sup>;  $\sigma$  – напряжение, Па;  $\varepsilon$  – деформация, %.

Гистерезис ( $Hys$ ) рассчитывали как отношение разницы между площадями под кривыми «нагрузки» и «разгрузки» (площадь петли гистерезиса), к удельной потенциальной энергии деформации ( $\varepsilon = 75\%$ ), значения выражали в %.

Экспериментальные кривые в координатах деформация/напряжение для параллельных измерений обрабатывали, как описано в приложении 1 (доверительный интервал – 95%).

## 2.7 Исследование сорбционных свойств криогелей хитозана

Головной раствор ализаринового красного S (АК) с концентрацией 1000 мг/л готовили путём растворения точной навески сухого красителя в дистиллированной воде. Рабочие растворы получали путем разбавления головного раствора водой, при необходимости рН растворов регулировали добавлением 0.1 М растворов NaOH или HCl.

Сорбционные свойства криогелей исследовали в статическом и динамическом режимах.

Во всех экспериментах в статических условиях соотношение Т:Ж (сухой криогель:раствор) составляло 1:1000, время контакта – 24 ч. Растворы постоянно перемешивали на орбитальном шейкере Biosan PSU-20i (Латвия) со скоростью 200 оборотов/мин (об./мин) при температуре +25 °С. Равновесную концентрацию

красителя определяли спектрофотометрически при длине волны 520 нм, используя спектрофотометр UV-1650PC Shimadzu (Япония). С учетом того, что интенсивность поглощения красителя АК зависит от pH, для построения калибровочной кривой и анализа равновесного содержания АК после сорбции ко всем пробам добавляли 0.1М раствор NaOH в объеме, необходимом для обеспечения постоянства pH во всех анализируемых пробах. Величину сорбции ( $\Gamma$ ) рассчитывали по разнице исходной и равновесной концентрации красителя по формуле (8):

$$\Gamma = \frac{(C_0 - C_p) \cdot V}{m}, \quad (8)$$

где  $\Gamma$  – сорбция, моль/г;  $V$  – объем раствора, л;  $C_0$  – начальная концентрация адсорбата, моль/л;  $C_p$  – равновесная концентрация адсорбата, моль/л;  $m$  – масса сорбента, г.

Изотермы сорбции аппроксимировали с использованием модели Ленгмюра (формула 9) и программы Origin 2018 для расчета констант уравнения:

$$\Gamma = \frac{(K_L \cdot Q_{\max}) \cdot C_p}{1 + K_L \cdot C_p}, \quad (9)$$

где  $\Gamma$  – величина сорбции, моль/г;  $C_p$  – равновесная концентрация адсорбата, моль/л;  $K_L$  – константа Ленгмюра, л/г;  $Q_{\max}$  – максимальная сорбционная ёмкость, моль/г.

Зависимость сорбционной емкости АК от pH исследовали на криогеле ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 из растворов с концентрацией красителя 500 мг/л в диапазоне pH от 2 до 10. Максимальную сорбционную емкость криогелей хитозана, сшитых ДЭЭГ при мольных соотношениях 1:1, 1:2 и 1:4, 1:8, 1:12 и 1:20, определяли из раствора с исходной концентрацией АК 1000 мг/л при pH 5.6. Изотермы сорбции АК на криогеле ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 рассчитывали из данных о сорбции АК из растворов с начальными концентрациями АК от 25 до 1000 мг/л при pH 5.6.

Сорбцию в динамическом режиме АК на монолитном сорбенте ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 исследовали следующим образом: раствор красителя с концентрацией 20 мг/л, pH 5.6 пропускали с помощью перистальтического насоса через колонку (шприц) с

1 мл монолитного криогеля (внутренний диаметр – 4.5 мм, высота слоя – 60 мм) со скоростью 20 колочных объемов в час (к.о./ч). Фильтрат отбирали порциями объемом 5 мл и определяли содержание АК, как описано выше. Динамическую сорбционную ёмкость (ДСЕ) рассчитывали по уравнению (10). Эффективную динамическую адсорбционную ёмкость рассчитывали для объема, при котором наблюдали проскок в 10 % от начальной концентрации красителя.

$$\text{ДСЕ} = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^n (C_0 - C_i) V_i \quad (10)$$

где  $C_0$  – исходная концентрация адсорбата (мг/л);  $C_i$  – концентрация адсорбата в каждой  $i$ -й порции выходящего раствора (мг/л);  $V_i$  – объем  $i$ -й порции выходящего раствора (мл);  $m$  – масса сухого сорбента (г);  $n$  – количество отобранных проб объемом  $V_i$ .

Эффективность регенерации криогеля после сорбции АК исследовали следующим образом: АК сорбировали на криогеле ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 из раствора с концентрацией 20 мг/л при рН 5.6 и рассчитывали эффективность извлечения (R) по формуле (11). Затем к 5 мг сорбента добавляли элюент в количестве 1 мл и выдерживали в течение 3 ч. В качестве элюентов в предварительных экспериментах использовали растворы 0.01 М, 0.1 М NaOH и 0.3 М NaOH. Содержание АК в элюате определяли спектрофотометрически после доведения рН анализируемого раствора с помощью 1–5 М растворов HCl до рН калибровочного раствора АК. Эффективность элюирования (Э, %) рассчитывали по формуле (12):

$$R = \frac{C_0 - C}{C_0} \cdot 100 \% \quad (11)$$

где  $C_0$  – начальная концентрация АК, мг/л;  $C$  – равновесная концентрация АК, мг/л.

$$\text{Э} = (C_{\text{э}} \cdot V_{\text{э}} / m) / \Gamma \cdot 100\%, \quad (12)$$

где  $C_{\text{э}}$  – концентрация красителя в элюате, мг/л;  $V_{\text{э}}$  – объем элюата, мл;  $m$  – масса сорбента, г;  $\Gamma$  – величина сорбции красителя на криогеле до элюирования, мг/г.

После элюирования сорбент ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 последовательно промывали водой (10 мл), 0.1 М HCl (10 мл) и снова водой до нейтрального значения промывных вод. Описанную процедуру считали первым циклом сорбции-элюирования. Всего для выбранной оптимальной концентрации NaOH проведено 3 цикла сорбции-элюирования.

## **2.8 Получение и исследование свойств композитных катализаторов на основе криогелей хитозана**

Катализаторы на основе криогелей хитозана, содержащие 15 мг/г наночастиц палладия, получали следующим образом: диски криогелей ДЭЭГ:ХТЗ 1:4, ДЭБД:ХТЗ 1:4, ДЭПЭГ:ХТЗ 1:4 диаметром 8.5–10 мм и толщиной ~ 3 мм (сухая масса ~ 3 мг) пропитывали 0.1 мл раствором PdCl<sub>2</sub> в 0.1 М растворе HCl с концентрацией палладия 500 мг/л и оставляли на 24 ч. Затем к дискам добавляли 1 мл дистиллированной воды, аккуратно встряхивали и определяли содержание палладия в растворе атомно-абсорбционным методом. Степень извлечения палладия криогелями составляла более 99 %. Диски промывали водой до нейтральной реакции, погружали в 0.5 %-ный раствор NaBH<sub>4</sub> и выдерживали в течение 2 ч для восстановления Pd(II), полученные композитные катализаторы сушили при комнатной температуре до постоянного веса.

Морфологию композитных катализаторов исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием электронного микроскопа со спектрометром ТМ-3000 Hitachi (Япония).

Оценку каталитической активности криогелей ДЭ:ХТЗ/Pd(0) в зависимости от матрицы носителя катализатора проводили на примере модельной реакции восстановления пара-нитрофенола следующим образом: к 5 мл 0.0001 М раствора пара-нитрофенола в воде добавляли 5 мг катализатора криогеля ДЭ:ХТЗ/Pd(0) и 1.9 мг NaBH<sub>4</sub>, перемешивали и через определенные промежутки времени

определяли оптическую плотность раствора на спектрофотометре UV-1650PC Shimadzu (Япония) при длине волны 400 нм, соответствующей максимуму поглощения пара-нитрофенола в щелочной среде. На основании данных об изменении оптической плотности рассчитывали концентрацию пара-нитрофенола в определенный момент времени по калибровочной кривой и степень конверсии.

Считали, что реакция восстановления пара-нитрофенола при избытке восстановителя является реакцией псевдопервого порядка и подчиняется кинетическому уравнению:

$$kC = -\frac{dC}{d\tau} \quad (13)$$

где  $k$  – константа скорости реакции;  $C$  – концентрация пара-нитрофенола, моль/л;  $\tau$  – время, мин.

После линеаризации экспериментальных данных в координатах  $\ln C$ - $\tau$  константу скорости реакции рассчитывали по формуле:

$$k = -\operatorname{tg}\alpha \quad (14)$$

где  $\alpha$  – угол наклона прямой ( $\ln C$ - $\tau$ ) к оси времени.

## 2.9 Биологические свойства криогелей хитозана

### 2.9.1 Ферментативный гидролиз криогелей хитозана

Гидролитическую устойчивость криогелей хитозана ДЭ:ХТЗ 1:4 оценивали гравиметрическим методом. Набухшие в воде криогели нарезали на диски диаметром 10 мм и высотой 4 мм одинакового веса (сухая навеска ~ 5 мг), удаляли избыток влаги и добавляли 1 мл PBS, pH 7.4 с содержанием  $\beta$ -глюканазы 330 ед./мл. В качестве контрольного образца использовали диски криогелей, погруженные в PBS без фермента. Герметичные пробирки с контрольными и экспериментальными образцами термостатировали при температуре +37 °C в циркуляционном термостате LOIP LT-205a ЗАО «Лабораторное оборудование и

приборы» (Россия) в течение 24 ч или заданного промежутка времени при исследовании кинетики деградации. Затем криогели извлекали, тщательно промывали дистиллированной водой и сушили при температуре +90 °С до постоянного веса. При исследовании кинетики деградации криогелей ДЭПЭГ:ХТЗ с разной степенью сшивки диски извлекали через заданные интервалы времени и проводили аналогичные операции.

Процент потери массы (ПМ) криогеля в результате ферментативного гидролиза (глубину гидролиза за 24 ч) рассчитывали по формуле (15):

$$\text{ПМ (\%)} = \frac{(W_0 - W_t) \times r}{W_0} \times 100 \%, \quad (15)$$

где  $r$  – коэффициент изменения массы контрольного образца (без фермента);  $W_0$  – масса исходного образца, г;  $W_t$  – масса образца после 24 ч гидролиза, г.

Константу скорости ферментативной деградации криогелей рассчитывали, используя уравнение кинетики реакции псевдопервого порядка (16):

$$\frac{W_t}{W_0} = e^{-k_1 t} \quad (16)$$

где  $W_0$  – масса исходного образца, г;  $W_t$  – масса образца через время  $t$  (ч) после начала гидролиза, г;  $k_1$  – константа скорости ферментативной деградации.

### ***2.9.2 Оценка цитотоксичности сшивающих реагентов и криогелей хитозана по отношению к опухолевым клеткам человека и применение криогелей для трехмерного культивирования клеток***

Клетки карциномы прямой кишки человека, НСТ 116 (Sigma-Aldrich Corp., США) культивировали в 24-х луночных планшетах (TPP, Швейцария) или в дисках криогелей ДЭБД:ХТЗ 1:4 и ДЭПЭГ:ХТЗ 1:12 толщиной 4 мм в 1 мл питательной среды ДМЕМ с добавлением 10 % (об/об) эмбриональной телячьей сыворотки, 3.7 мг/мл бикарбоната натрия (Sigma-Aldrich), однократной смеси заменимых

аминокислот (Gibco), 100 единиц/мл пенициллина (Gibco) и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco). Плотность клеток при заселении составляла  $100 \times 10^3$  и  $500 \times 10^3$  клеток/лунку при культивировании в культуральной посуде (2D) и криогелях (3D) соответственно.

Для оценки цитотоксичности сшивающих реагентов в лунку добавляли ДЭБД или ДЭПЭГ в концентрациях, соответствующих мольным соотношениям при сшивке ДЭБД:ХТЗ 1:4 и ДЭПЭГ:ХТЗ 1:12. После заселения клетками культивирование проводили в углекислотном инкубаторе ( $+37\text{ }^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , влажность 90 %) в течение 14 дней. Питательную среду меняли каждые 2 дня. Состояние клеток ежедневно контролировали под инвертированным микроскопом СКХ41 (Olympus, Япония), оснащенный системой фазового контраста, и снимали с помощью цветной цифровой камеры AxioCam 105 (Carl Zeiss, Германия) в ПО ZEN 2 (Blue edition, Carl Zeiss).

Функциональную активность и плотность клеток через 3 и 24 ч культивирования в присутствии ДЭБД и ДЭПЭГ и через 3, 7 и 10, 14 суток в присутствии криогелей анализировали с помощью окрашивания флуоресцентными красителями с последующей проточной цитометрией. Исследования проведены в лаборатории клеточных технологий Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН к.б.н. А.В. Бородой и аспирантом Д.Д. Малышевым в рамках проекта РФФИ № 20-13-00399 (Ю.О. Привар – основной исполнитель). Детальное описание методики проведения эксперимента приведено в работах [153,154].

Клетки из криогелей открепляли добавлением раствора, содержащего 0.05 % трипсина и 0.02 % этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), и выдерживанием в течение 60 мин, аналогично открепляли/диссоциировали клетки, растущие в адгезионном состоянии в культуральной посуде. Клетки окрашивали BioTracker™ 405 (Sigma-Aldrich) для оценки митохондриальной активности, TO-PRO-3™ (Invitrogen, США) для детекции апоптотических клеток и 0.5 мкМ SYTO9™

(Invitrogen, США) для окрашивания всех клеток и исключения при обработке данных дедриса клеток и фрагментов криогелей. Суспензию клеток анализировали с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX S (Beckman-Coulter, США). Единичные события (более 95 % всех событий) выбирали треугольным гейтированием на двумерном графике FSC-A против FSC-H для исключения агрегатов из дальнейшего анализа. В пробе анализировали не менее 20000 событий.

### ***2.9.3 Исследование биосовместимости криогелей хитозана *in vivo****

Биосовместимость криогеля ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 изучали *in vivo* при внутримышечной имплантации пяти мышам-самцам линии СВА в возрасте трех месяцев со средней массой тела 22.0–24.0 грамма. Все манипуляции с лабораторными животными проводились в соответствии с общепринятыми этическими нормами и правилами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS №123).

Имплантацию криогелей, цилиндрической формы (диаметр 1 мм, толщина 0.4 мм), предварительно стерилизованных в водном растворе диэтилпиракарбоната с концентрацией 0.02–0.03%, осуществляли путем рассечения дермы и мышечной фасции с боковой стороны левого бедра мыши с последующим введением образцов в мышечную ткань на глубину 2–3 мм [155]. Кожу над мышцей с имплантатом зашивали шелковой нитью с диаметром 0.100–0.149 мм. Время экспозиции составляло 14 суток; в качестве контроля использовали мышечную ткань правого бедра после аналогичных манипуляций без имплантации криогеля.

Фиксацию биопсийной ткани проводили в 10 % формалине, затем заливали парафином согласно стандартным методикам подготовки гистологических образцов [156]. Для общей визуализации структуры ткани препараты были окрашены гематоксилином и эозином, а для идентификации коллагеновых волокон

окрашены по Ван Гизону [156]. Исследования проведены сотрудником Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, к.х.н. Нестеровым Д.В.

## ГЛАВА 3 ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЕ И КРИОТРОПНОЕ ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЕ В РАСТВОРАХ ХИТОЗАН-ДИГЛИЦИДИЛОВЫЕ ЭФИРЫ (ДЭ)

### 3.1 Гелеобразование в растворах хитозан-ДЭ

При анализе факторов, влияющих на эффективность сшивки хитозана диглицидиловыми эфирами (ДЭ) в кислой среде, мы исходили из того, что эта реакция протекает по механизму нуклеофильного замещения, а скорость таких реакций определяется природой нуклеофила. Как отмечалось в литературном обзоре, все неудачные попытки сшивки хитозана ДЭ в кислой среде предпринимались в уксуснокислых растворах, часто при значительном избытке кислоты. Поскольку принципиальная возможность протекания реакции между эпоксидами и аминами не вызывает сомнений [63], наблюдаемую низкую эффективность сшивки хитозана можно в первую очередь связать с тем, что полностью протонированная при избытке кислоты аминогруппа хитозана не является нуклеофилом. В то же время, ацетат-ион в уксуснокислых растворах является нуклеофилом и может конкурировать с хитозаном в реакциях с ДЭ, что ранее не принималось во внимание.

В связи с этим на первом этапе мы сравнили, как замена уксусной кислоты на соляную при растворении хитозана влияет на эффективность гелеобразования в 3%-ном растворе хитозана в присутствии эквимольного количества ДЭЭГ (ДЭЭГ:ХТЗ 1:1). В предварительном эксперименте было установлено, что в уксуснокислых растворах гелеобразование, действительно, проходит медленнее, а полученные гели значительно сильнее набухают и хуже держат форму (рисунок 12А).

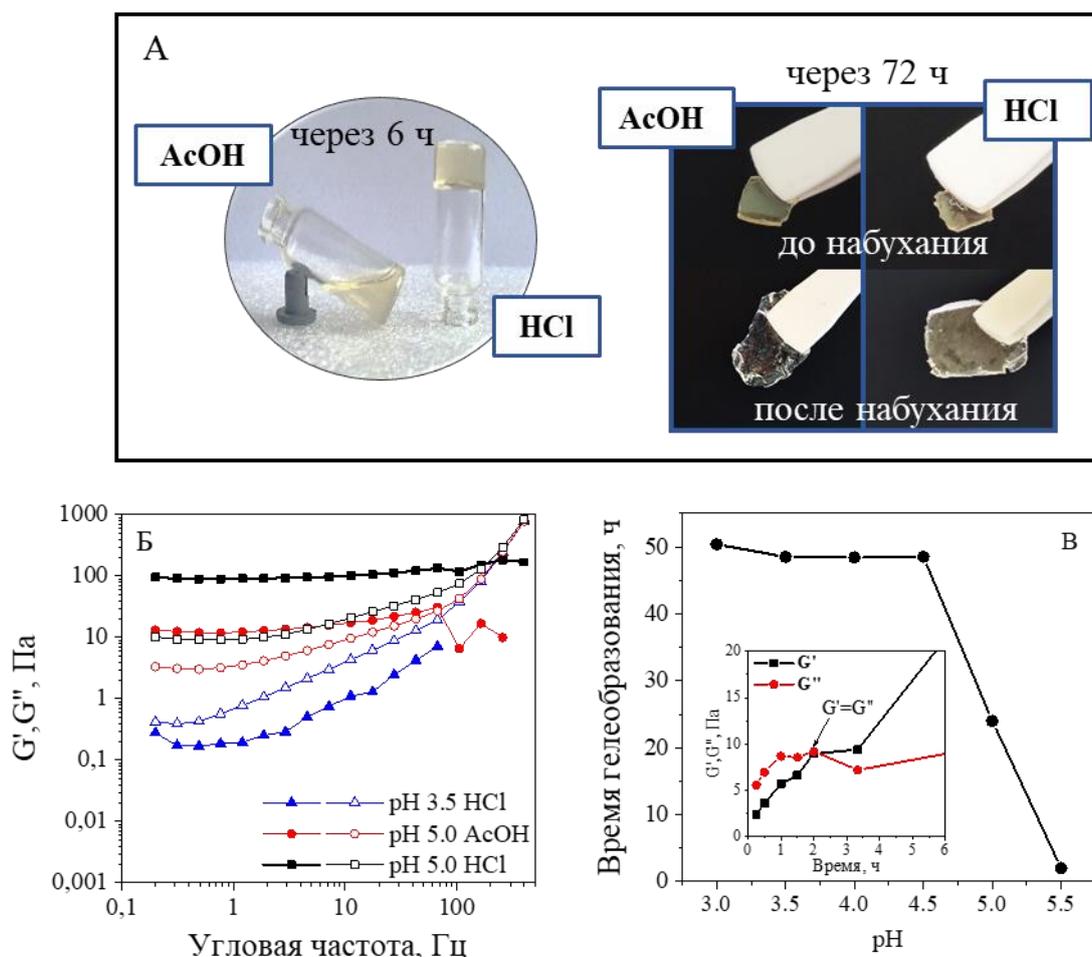


Рисунок 12 – Гелеобразование в 3%-ных уксуснокислых (AcOH) и солянокислых (HCl) растворах хитозана при мольном соотношении ДЭЭГ:ХТЗ 1:1 в зависимости от pH,  $T = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ : фотоизображения растворов хитозана pH 5.5, через 6 ч после добавления ДЭЭГ и соответствующих им гидрогелей через 72 ч до и после набухания в воде (А); частотные зависимости модулей накопления ( $G'$ , заполненные символы) и потерь ( $G''$ , пустые символы), записанные через 24 ч после добавления ДЭЭГ в растворы хитозана (Б); зависимость времени гелеобразования в солянокислом растворе хитозана от pH (В). Вставка: пример определения времени гелеобразования при сшивке хитозана ДЭЭГ при pH 5.5

Мониторинг частотных зависимостей модулей накопления ( $G'$ ) и потерь ( $G''$ ) от времени показал, что в уксуснокислом растворе ДЭЭГ:ХТЗ 1:1 при pH 5.0 через 24 ч формировались очень слабые гели с отношением модулей  $G'/G'' = 1.8$  (рисунок 12Б), тогда как в солянокислом растворе формировался прочный гель с отношением модулей  $G'/G'' > 10$  (рисунок 12Б). Несмотря на то, что при pH 5.0 гелеобразование протекало заметно более эффективно в солянокислом растворе ДЭЭГ:ХТЗ 1:1, его реологическое поведение при pH 3.5 через 24 ч все ещё было

типичным для раствора полимера  $G' < G''$  (рисунок 12Б). Более детальное исследование влияния рН на скорость гелеобразования в солянокислых растворах ДЭЭГ:ХТЗ 1:1 провели в интервале рН 3.0–5.5, в котором хитозан сохраняет хорошую растворимость. Установлено, что при рН 3.0–4.5 время гелеобразования практически не изменялось и составляло 48–50 ч, после чего резко сокращалось до 2 ч при рН 5.5 (рисунок 12В). Такая зависимость скорости гелеобразования от рН характерна и для других сшивающих реагентов, реагирующих с хитозаном по аминогруппам [46], и коррелирует с повышением нуклеофильности аминогруппы с ростом рН, т.е. снижением степени протонирования.

Исследование зависимости времени гелеобразования от длины цепи ДЭ проводили в уксуснокислых и солянокислых 3%-ных растворах хитозана при фиксированном значении рН (рН 5.5) и мольном соотношении ДЭ:ХТЗ 1:1. Кроме ДЭЭГ использовали коммерчески доступные ДЭ – ДЭБД и ДЭПЭГ, которые часто применяют в косметологии и регенеративной хирургии для сшивки гиалуроновой кислоты [157,158]. Из рисунка 13А видно, что время гелеобразования нелинейно зависит от длины цепи ДЭ и увеличивается в ряду: ДЭПЭГ < ДЭЭГ < ДЭБД как в солянокислых, так и в уксуснокислых растворах. Время гелеобразования в уксуснокислых растворах хитозана было в 3–3.7 раза больше при использовании короткоцепочечных сшивающих реагентов ДЭЭГ и ДЭБД, в то время как при применении ДЭПЭГ наблюдали незначительную разницу в скоростях гелеобразования в уксуснокислом и солянокислом растворе.

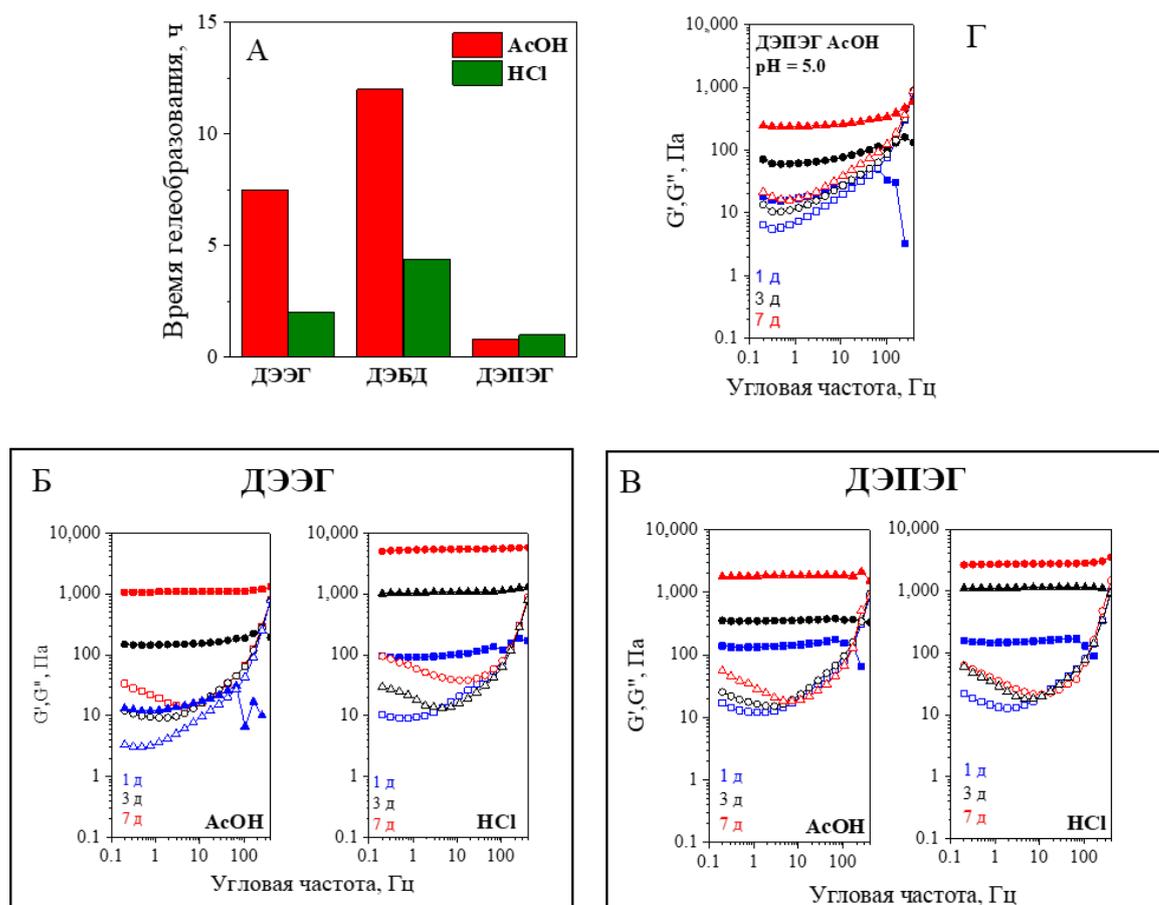


Рисунок 13 – Гелеобразование в 3%-ных уксуснокислых и солянокислых растворах хитозана при мольном соотношении ДЭ:ХТЗ 1:1, pH 5.5 (А–В) и 5.0 (Г),  $T = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$ : зависимость времени гелеобразования от длины цепи ДЭ (А); частотные зависимости модулей накопления ( $G'$ , заполненные символы) и потерь ( $G''$ , пустые символы) через один (1д), три (3д) и семь (7д) дней после добавления ДЭЭГ (Б) и ДЭПЭГ (В, Г) в растворы хитозана

Для реакционной смеси ДЭЭГ:ХТЗ отношение модулей  $G'_{\text{HCl}} / G'_{\text{AcOH}}$  при частоте 11.2 Гц через 24 ч составляло 5.9, подтверждая значительное снижение эффективности сшивки в уксуснокислом растворе. Падение  $G'$  в уксуснокислом растворе при увеличении частоты осцилляций до 65 Гц также свидетельствует об образовании более слабой полимерной сетки (рисунок 13Б). В случае длинноцепочечного сшивающего реагента (ДЭПЭГ) разница между модулями накопления в уксуснокислых и солянокислых растворах хитозана через 24 ч была незначительной (рисунок 13В), что хорошо коррелирует с близкими временами

гелеобразования в этих системах (рисунок 13А). Через семь суток после добавления ДЭ в растворы хитозана разница в эффективности сшивки в зависимости от длины цепи сшивающего реагента сохранилась: отношение модулей  $G'_{\text{HCl}} / G'_{\text{AcOH}}$  составило 5.1 и 1.5 для ДЭЭГ и ДЭПЭГ соответственно. Таким образом, снижение эффективности сшивки в уксуснокислом растворе было менее выражено при применении ДЭПЭГ.

Так же как и в случае ДЭЭГ, депротонирование аминогрупп хитозана с ростом рН оказывает положительное влияние на эффективность сшивки ДЭПЭГ. Так, в результате сшивки хитозана ДЭПЭГ в уксуснокислых растворах при рН 5.5 образуются заметно более прочные гели (рисунок 13В), чем при рН 5.0 (рисунок 13Г). Однако настолько заметное влияние длины цепи ДЭ на эффективность сшивки при одном и том же значении рН в уксуснокислых и солянокислых растворах не может быть объяснено исключительно снижением нуклеофильности аминогрупп хитозана, как предполагалось в работе [5]. Более вероятные причины влияния природы кислоты на эффективность гелеобразования в растворах хитозан-ДЭ рассматриваются в разделе 3.3.

### 3.2 Криотропное гелеобразование в растворах хитозан-ДЭ

Известно, что в частично замороженных многокомпонентных растворах, где часть компонентов реакционной смеси вытесняется из формирующихся кристаллов растворителя в незамерзающие микроканалы, за счет эффекта криоконцентрирования ускоряются химические реакции и сшивки могут сформироваться даже в тех растворах, в которых они не формируются при комнатной температуре [89]. Поскольку основная задача данного исследования заключалась в разработке метода получения ковалентно сшитых криогелей хитозана, на первом этапе влияние температуры на реакционную способность хитозана в реакции с ДЭ оценивали в системе ДЭЭГ:ХТЗ 1:1 в солянокислом

растворе при рН 5.0, т.е. в условиях, в которых при температуре +25 °С сшивка проходила эффективно. Время сшивки при температуре –5, –10 и –20 °С варьировали от 6 до 12 дней. В качестве критерия эффективности сшивки использовали проницаемость – максимальную скорость потока жидкости, которую выдерживает монолитный криогель хитозана объемом 1 мл (внутренний диаметр 4.5 мм, высота слоя – 60 мм) (рисунок 14).

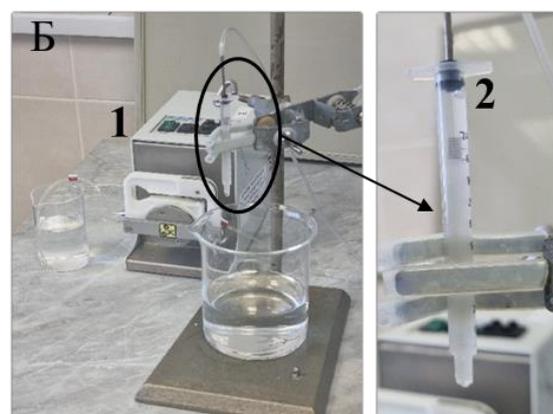
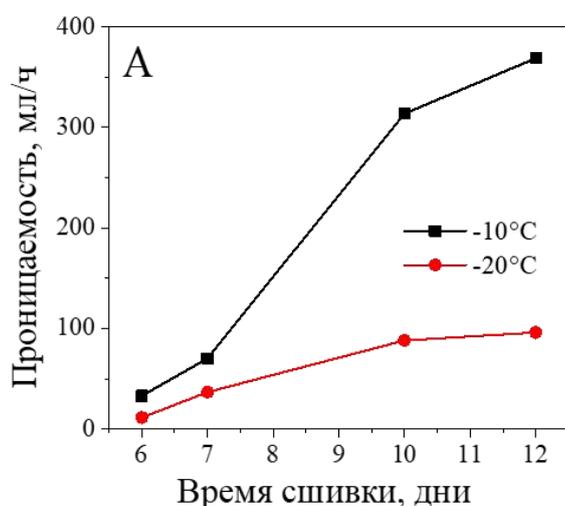


Рисунок 14 – Зависимость проницаемости криогелей хитозана от времени сшивки. Сшивка проводилась в солянокислом 3%-ном растворе хитозана, рН 5.0, мольное соотношение ДЭЭГ: ХТЗ 1: 1, температура –10 и –20 °С (А); фотоизображение установки для определения проницаемости (максимальной скорости потока жидкости через 1 мл криогеля: 1 – перистальтический насос, 2 – колонка с монолитным криогелем хитозана (Б))

При температуре –5 °С получить проницаемые криогели не удалось: на шестые сутки гель легко выдавливался через носик колонки при минимальном давлении, на двенадцатые сутки наблюдали значительный рост сопротивления на колонке. При температуре –20 °С с увеличением времени сшивки от 7 до 12 суток наблюдали незначительное увеличение проницаемости криогелей с выходом на плато при максимальной скорости потока 95 мл/ч (рисунок 14А). Получение достаточно слабых криогелей, наиболее вероятно, связано с низкой реакционной

способностью хитозана и ДЭ при этой температуре. При температуре  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  наблюдали четырёхкратный рост максимальной скорости потока жидкости через криогель (до 400 мл/ч) при увеличении времени сшивки с 7 до 12 суток. На основании полученных данных температуру  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  и время сшивки 12 суток приняли в качестве оптимальных условий для получения криогелей хитозана с использованием в качестве сшивающих реагентов ДЭ с разной длиной цепи.

При температуре  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  из солянокислых растворов в одну стадию при мольных соотношениях ДЭ:ХТЗ от 2:1 до 1:20 были получены механически прочные криогели (рисунок 15А).

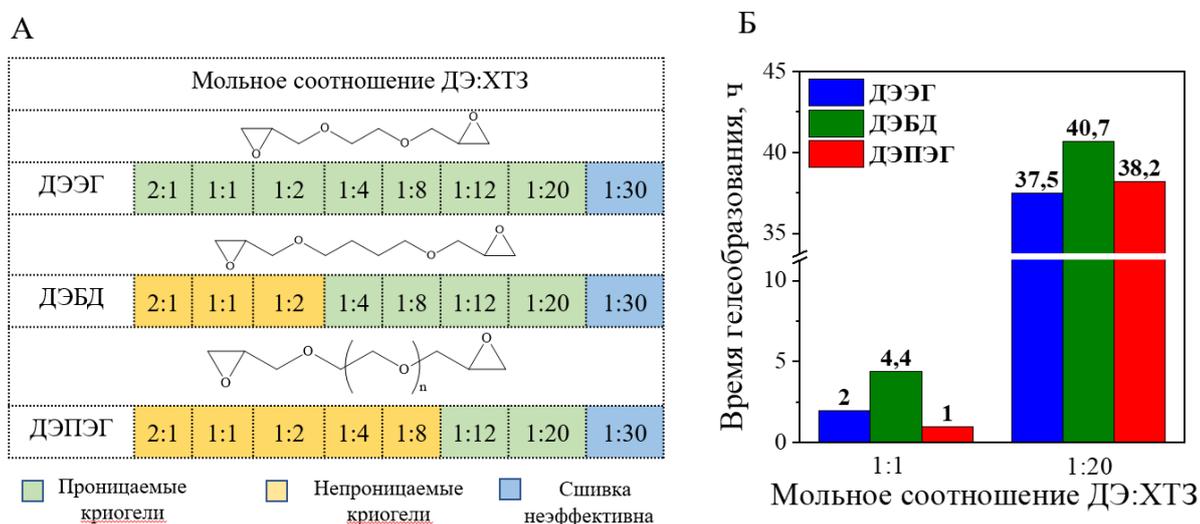


Рисунок 15 – Результаты сшивки хитозана диглицидиловыми эфирами (ДЭЭГ, ДЭБД, ДЭПЭГ) в солянокислом растворе в зависимости от мольного соотношения ДЭ:ХТЗ, рН 5.5, температура  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , время сшивки 12 суток (А); времена гелеобразования в солянокислом растворе хитозана (рН 5.5) при мольных соотношениях ДЭ:ХТЗ 1:1 и 1:20, рН 5.5, температура  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Б)

Несмотря на то, что при комнатной температуре время гелеобразования в солянокислых растворах при соотношении ДЭ:ХТЗ 1:20 увеличивалось до 37–40 ч (рисунок 15Б), полученные криогели хорошо сохраняли форму после извлечения из шприцев (рисунок 16А) без увеличения времени сшивки. Таким образом, по сравнению с ранее описанными в литературе примерами сшивки хитозана ДЭ в кислой среде за счет оптимизации состава раствора и рН нам удалось получить не

только гели, но и криогели хитозана при низких концентрациях ДЭ, сопоставимых с минимальными концентрациями ГА, используемым для сшивки хитозана.

Из частично замороженных уксуснокислых 3%-ных растворов хитозана криогели удалось получить только при мольных соотношениях ДЭ:ХТЗ 1:1 (рисунок 16А).

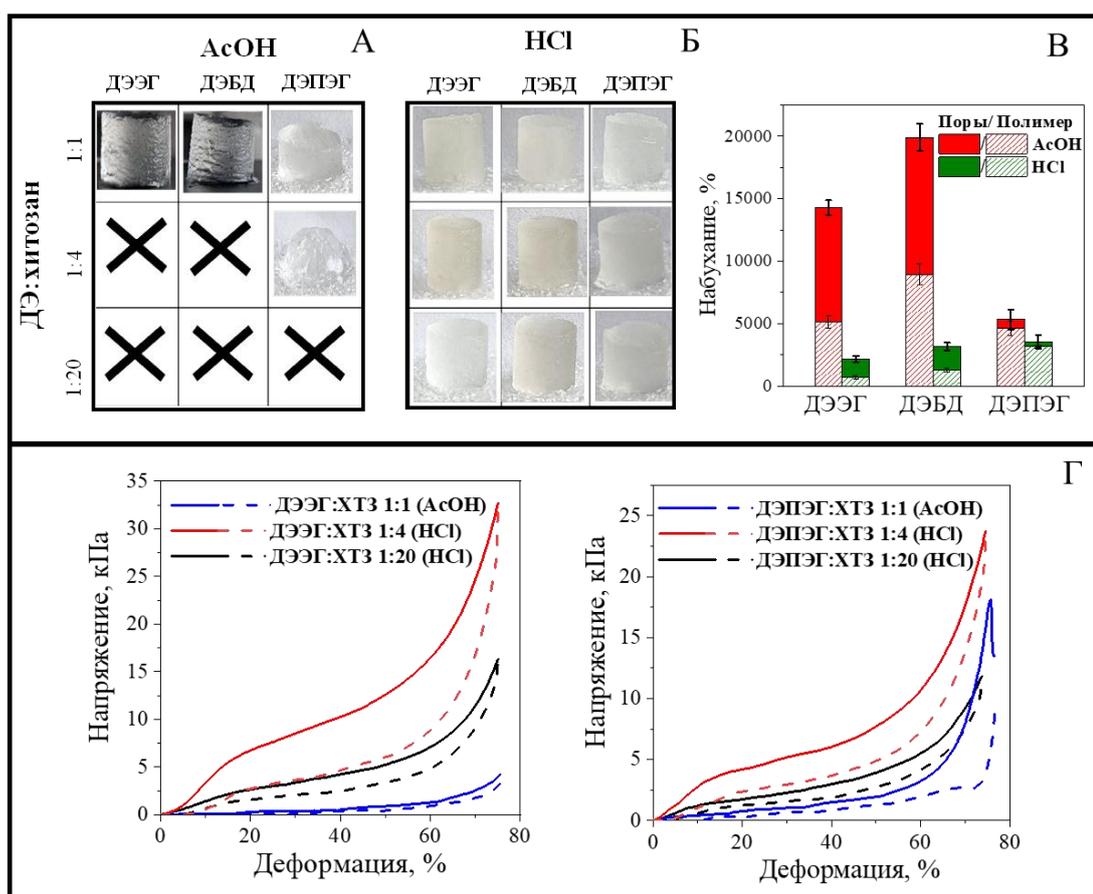


Рисунок 16 – Фотоизображения (А и Б) и сравнительные характеристики (В и Г) криогелей хитозана, полученных из 3%-ных солянокислых (НСl) и уксуснокислых (AcOH) растворов хитозана, рН 5.5. Равновесное набухание в воде криогелей хитозана ДЭ:ХТЗ 1:1 (В). Деформационные кривые при одноосном сжатии набухших криогелей хитозана, сшитых ДЭЭГ и ДЭПЭГ при указанных на графиках условиях (Г). Знак «X» означает, что криогель, сохраняющий форму после извлечения из молда, получить не удалось

Низкая эффективность сшивки в уксуснокислых растворах подтверждается значениями степени набухания криогелей, которые в 6.5–6.7 раз выше по сравнению с криогелями, полученными из солянокислых растворов (рисунок 16В).

Механические свойства криогелей, полученных из солянокислых растворов при низких концентрациях сшивающих реагентов, также значительно лучше, чем свойства криогелей, полученных в уксуснокислых растворах при соотношении ДЭ:ХТЗ 1:1 (рисунок 16Г). Наименьшая разница в набухании криогелей ( $< 50\%$ ) в зависимости от типа кислоты, используемой для растворения хитозана, наблюдалась при сшивке ДЭПЭГ (рисунок 16Г). При сшивке в уксуснокислых растворах криогель ДЭПЭГ:ХТЗ 1:1 был существенно прочнее, чем криогель ДЭЭГ:ХТЗ 1:1, хотя в солянокислых растворах наблюдалась противоположная закономерность, и криогели, сшитые ДЭЭГ, отличались более высокими значениями нагрузки при сжатии (рисунок 16Г). Таким образом, в условиях криотропного гелеобразования наблюдался тот же эффект, что был отмечен при комнатной температуре: падение эффективности сшивки в уксуснокислых растворах было менее выраженным для ДЭПЭГ. Эффект криоконцентрирования не оказывал положительного влияния на эффективность сшивки хитозана ДЭ в уксуснокислых растворах, а общие причины, приводящие к получению в таких системах слабых гелей при комнатной температуре и отсутствию сшивки в частично замороженных растворах, следует искать в особенностях протекания реакции между хитозаном и ДЭ в солянокислых и уксуснокислых растворах.

### **3.3 Особенности механизма сшивки хитозана ДЭ в уксуснокислых и солянокислых растворах**

Как отмечалось выше, изменение нуклеофильности аминогруппы хитозана может объяснить зависимость эффективности сшивки хитозана от pH, но не объясняет того факта, что при переходе от сшивки в уксуснокислых растворах к сшивке в солянокислых растворах время гелеобразования уменьшается в 3–4 раза для ДЭЭГ и ДЭБД и практически не меняется для ДЭПЭГ. Мы предположили, что низкая эффективность сшивки хитозана ДЭ в уксуснокислых растворах и

нелинейная зависимость времени гелеобразования от длины цепи ДЭ обусловлены конкуренцией между целевой и побочными реакциями, вероятность протекания которых зависит от длины цепи ДЭ (схема 3).

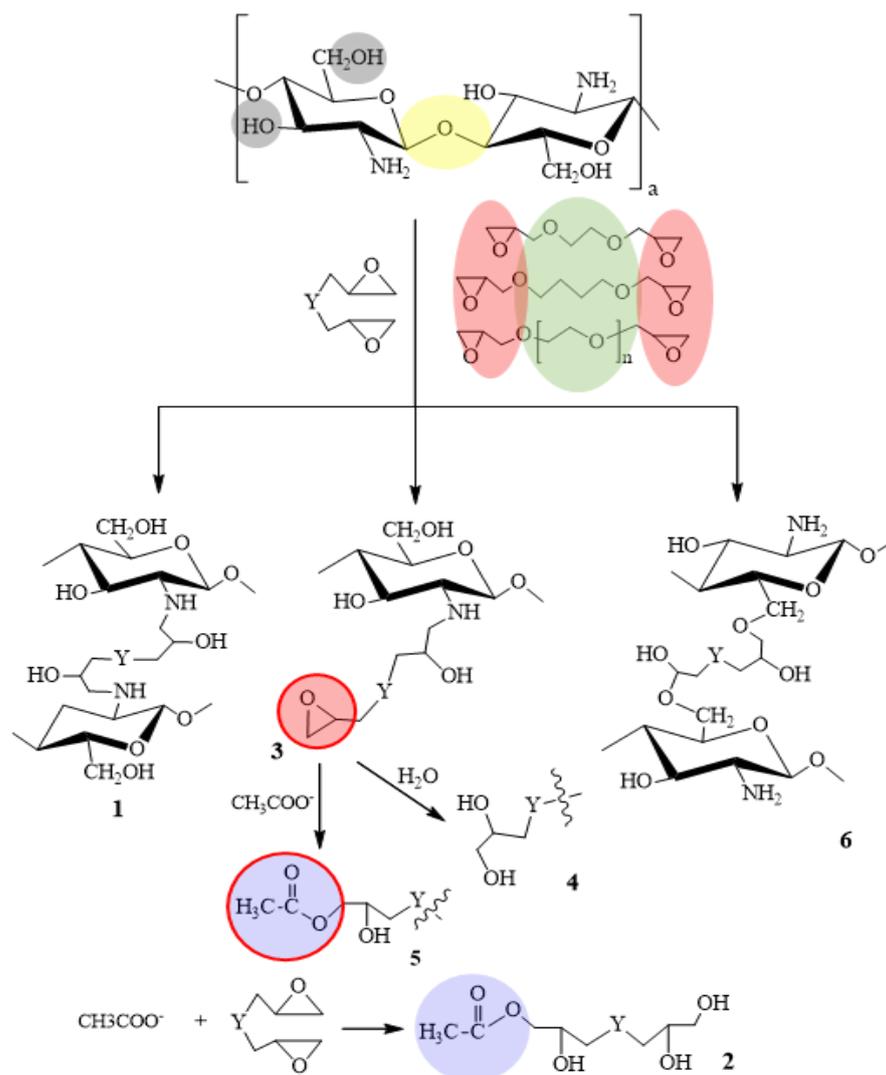


Схема 3 – Возможные реакции в солянокислых (1,3,4,6) и уксуснокислых (1-6) растворах хитозан-ДЭ. Цветовые обозначения структурных мотивов на схеме аналогичны цветовым обозначениям соответствующих им полос в ИК-спектрах

Целевая реакция сшивки может протекать по аминогруппам и, с меньшей вероятностью, по гидроксильным группам хитозана (схема 3, реакции 1 и 6 соответственно). Возможные побочные реакции включают прививку ДЭ в боковую цепь без образования сшивки (схема 3, реакция 3) с последующей деактивацией

эпоксидной группы при взаимодействии с водой (схема 3, реакция 4) или ацетат-ионом (схема 3, реакция 5), а также взаимодействие ДЭ с уксусной кислотой с образованием сложного эфира (схема 3, реакция 2).

Для проверки выдвинутых гипотез взаимодействие хитозана с ДЭ с разной длиной цепи исследовали с применением метода ИК-Фурье спектроскопии. ИК спектры записывали для: 1) лиофилизированных реакционных смесей (уксуснокислые и солянокислые растворы ДЭ:ХТЗ 1:1 через 1, 3, 7 дней после начала реакции и дополнительно через 1 ч в случае ДЭПЭГ); 2) лиофилизированных через 7 дней после начала реакции реакционных смесей после удаления растворимых продуктов реакции (образцы обозначены как гидрогели (EtOH)); 3) криогелей хитозана.

Анализировали следующие области ИК-спектров:

- 1730–1750  $\text{см}^{-1}$  для идентификации сложных эфиров уксусной кислоты, образующихся в побочных реакциях с ДЭ [159];
- 1000–1200  $\text{см}^{-1}$  для оценки изменений в положении и интенсивности частично перекрывающихся полос, соответствующих С–О–С связям в ДЭ (1092–1099  $\text{см}^{-1}$ ), 1,4-гликозидным связям С–О–С (1152  $\text{см}^{-1}$ ) и С–О связям (1064  $\text{см}^{-1}$  и 1024  $\text{см}^{-1}$ ) в хитозане [7,160], в зависимости от условий сшивки;
- 890–950  $\text{см}^{-1}$  для идентификации непрореагировавших эпоксидных групп ( $\sim 910 \text{ см}^{-1}$ ) [161] в продуктах реакции (гидрогелях и криогелях) на фоне полос, соответствующих симметричным валентным колебаниям 1,4-гликозидных связей в хитозане при 947 и 843  $\text{см}^{-1}$  [7].

Таким образом, положение основных полос в ИК-спектрах и их относительные интенсивности позволяют однозначно подтвердить образование сложных эфиров уксусной кислоты и наличие непрореагировавших эпоксидных

групп, а также качественно оценить изменение отношения ДЭ:ХТЗ в продукте реакции (гидрогель или криогель) относительно исходной реакционной смеси.

Сравнение ИК-спектров реакционных смесей ДЭЭГ:ХТЗ и ДЭПЭГ:ХТЗ в уксуснокислых и солянокислых растворах через 7 дней после добавления сшивающих реагентов (рисунки 17А и Б) показало, что только в уксуснокислых растворах появлялась полоса при  $1735\text{ см}^{-1}$ , подтверждающая образование сложного эфира (схема 3, реакции 2 или 5).

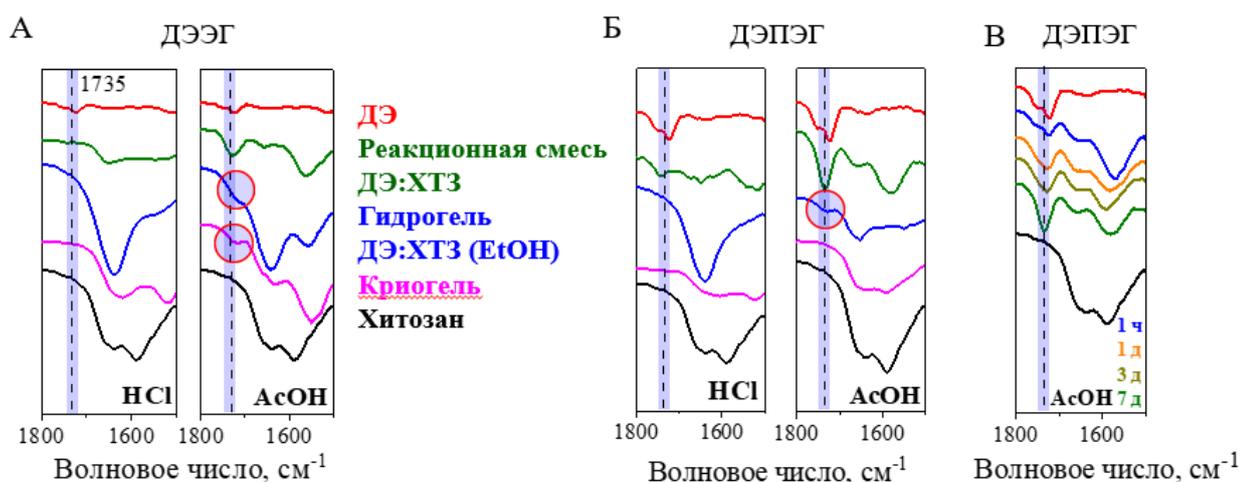


Рисунок 17 – ИК-Фурье спектры реакционных смесей (7д), гидрогелей (EtOH) и криогелей ДЭ:ХТЗ 1:1: сшивка ДЭЭГ (А) и ДЭПЭГ (Б) в 3%-ных солянокислых (HCl) и уксуснокислых (AcOH) растворах хитозана при pH 5.5. ИК-Фурье спектры реакционной смеси ДЭПЭГ:ХТЗ 1:1 через 1 час (1ч) и 1, 3, 7 дней после добавления ДЭ (1д, 3д, 7д соответственно) (В). Спектры хитозана и ДЭ приведены для сравнения

Относительная интенсивность данной полосы в уксуснокислой реакционной смеси ДЭПЭГ:ХТЗ увеличивалась во временном интервале от 1 ч до 7 дней (рисунок 17В). Поскольку реологические исследования показали, что модуль накоплений в этой системе также увеличивался в этом промежутке времени (рисунок 13В), можно сделать вывод, что ДЭПЭГ расходовался как на целевую реакцию сшивки, так и на побочные реакции. Отсутствие интенсивной полосы при  $1735\text{ см}^{-1}$  в ИК-спектрах гидрогелей (EtOH) ДЭЭГ:ХТЗ и ДЭПЭГ:ХТЗ после удаления непрореагировавших исходных веществ и растворимых продуктов

реакции (рисунки 17А и Б) позволяет предположить, что при комнатной температуре побочная реакция между ДЭ и уксусной кислотой протекает преимущественно без участия хитозана (схема 3, реакция 2), хотя небольшое плечо в этой области ИК-спектров не исключает этерификацию концевых эпоксидных групп, привитых в боковую цепь ДЭ (схема 3, реакция 5). В ИК-спектре криогеля ДЭПЭГ:ХТЗ 1:1, полученного из уксуснокислого раствора, полоса при  $1735\text{ см}^{-1}$  отсутствует, а в криогеле ДЭЭГ:ХТЗ 1:1 её относительная интенсивность выше, чем в соответствующем гидрогеле ДЭЭГ:ХТЗ (EtOH) (рисунок 17А). Это свидетельствует о большей вероятности прививки ДЭЭГ в боковую цепь с последующей этерификацией при проведении сшивки в частично замороженном растворе (схема 3, реакция 5), что также негативно сказывается на механических свойствах криогеля ДЭЭГ:ХТЗ 1:1 (рисунок 16Г).

На основании выраженной зависимости времени гелеобразования (рисунок 13А) и механических свойств реакционных смесей (рисунок 13Б, В) и криогелей (рисунок 16Г) от длины цепи ДЭ, можно предположить, что различия в реакционной способности ДЭ в исследованном ряду действительно влияют на вероятность прохождения целевой реакции сшивки хитозана и расхода сшивающего реагента на побочные реакции [162].

Если реакция сшивки хитозана проходит по аминогруппам (схема 3, реакция 1), то эквимольное соотношение ДЭ:ХТЗ в реакционной смеси соответствует двукратному избытку сшивающего реагента. Тогда при отсутствии побочных реакций в ИК-спектрах должны проявляться полосы при  $\sim 910\text{ см}^{-1}$ , соответствующие непрореагировавшим эпоксидным группам. Из анализа ИК-спектров реакционных смесей ДЭЭГ:ХТЗ и ДЭПЭГ:ХТЗ в уксуснокислых и солянокислых растворах через 1, 3 и 7 дней после добавления ДЭ видно, что раскрытие эпоксидного кольца в уксуснокислом растворе ДЭЭГ происходит значительно быстрее, чем в солянокислом (рисунок 18А), а в ДЭЭГ быстрее, чем в ДЭПЭГ (рисунок 18Б).

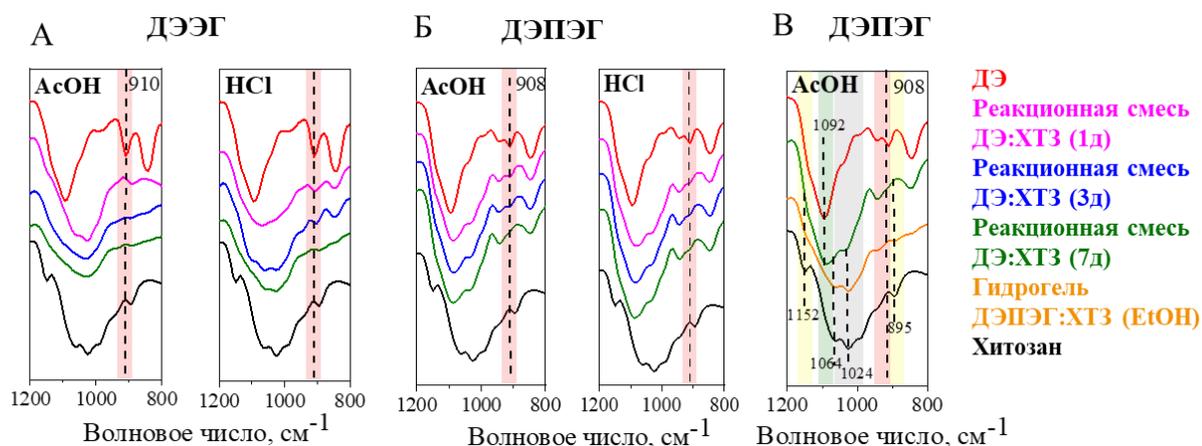


Рисунок 18 – ИК-Фурье спектры реакционных смесей ДЭ:ХТЗ 1:1 через 1,3,7 дней после добавления ДЭ (1д, 3д, 7д соответственно) и гидрогеля ДЭПЭГ:ХТЗ (EtOH): сшивка ДЭЭГ (А) и ДЭПЭГ (Б, В) в 3%-ных солянокислых (HCl) и уксуснокислых (AcOH) растворах хитозана при pH 5.5. Спектры хитозана и ДЭ приведены для сравнения

В уксуснокислом растворе ДЭЭГ:ХТЗ непрореагировавшие эпоксидные группы не обнаруживаются уже через 24 ч после начала реакции, тогда как в солянокислом они присутствуют и через 72 ч (рисунок 18А). Таким образом, можно говорить о том, что в результате более высокой реакционной способности ДЭЭГ активнее, чем ДЭПЭГ, вступает в побочные реакции с уксусной кислотой. Нецелевой расход сшивающего реагента приводит через 7 суток после начала сшивки к получению в уксуснокислом растворе слабого геля ДЭЭГ:ХТЗ с модулем накопления в 5 раз ниже, чем в солянокислом растворе (рисунок 13Б, В).

В ИК-спектрах солянокислых и уксуснокислых реакционных смесей ДЭПЭГ:ХТЗ через 72 ч идентифицируются непрореагировавшие эпоксидные группы, что объясняет менее резкое снижение эффективности сшивки в уксуснокислых растворах с применением этого сшивающего реагента (рисунок 18 Б, В). Хотя из литературных данных известно, что уксусная кислота является более эффективным катализатором реакций аминов с ДЭ [163], в исследуемой системе более низкая реакционная способность хитозана по сравнению с

низкомолекулярными аминами приводит к тому, что значительное количество ДЭ после раскрытия эпоксидного кольца под действием катализатора расходуется на побочную реакцию с уксусной кислотой [162].

Для качественного анализа вкладов побочных реакций прививки в боковую цепь (схема 3, реакция 3) с последующей дезактивацией второй эпоксидной группы (схема 3, реакции 4 и 5) и реакции с уксусной кислотой (схема 3, реакция 2) провели сравнительный анализ ИК-спектров в области  $1200\text{--}800\text{ см}^{-1}$  для реакционной смеси и гидрогеля ДЭПЭГ:ХТЗ (EtOH) после удаления растворимых реагентов и продуктов реакции (рисунок 18В). Наблюдаемое смещение в область низких частот полосы, являющейся результатом частичного перекрытия полос колебаний связей С–О–С в ДЭПЭГ ( $1092\text{ см}^{-1}$ ) и С–О в хитозане ( $1064\text{ см}^{-1}$ ), говорит о более высоком содержании хитозана в гидрогеле по сравнению с реакционной смесью. Это подтверждает вывод о преимущественном расходе ДЭ на побочную реакцию с образованием растворимых эфиров уксусной кислоты (схема 3, реакция 2), сделанный на основании резкого снижения интенсивности полосы при  $1735\text{ см}^{-1}$  в ИК-спектре гидрогеля по сравнению с реакционной смесью (рисунок 17Б).

Изменения в ИК-спектрах гидрогелей и криогелей в области частот  $1200\text{--}800\text{ см}^{-1}$  можно использовать и для сравнительной оценки реакционной способности хитозана при комнатной температуре и в частично замороженных растворах (рисунок 19, приложение 2). Так, в ИК-спектре криогеля ДЭПЭГ:ХТЗ относительно соответствующего гидрогеля наблюдается смещение в область низких частот широкой полосы  $1100\text{--}900\text{ см}^{-1}$  (колебания С–О–С в ДЭПЭГ и С–О в хитозане) (рисунок 19В), что говорит о снижении степени модификации хитозана сшивающим реагентом при температуре  $-10\text{ °C}$ .

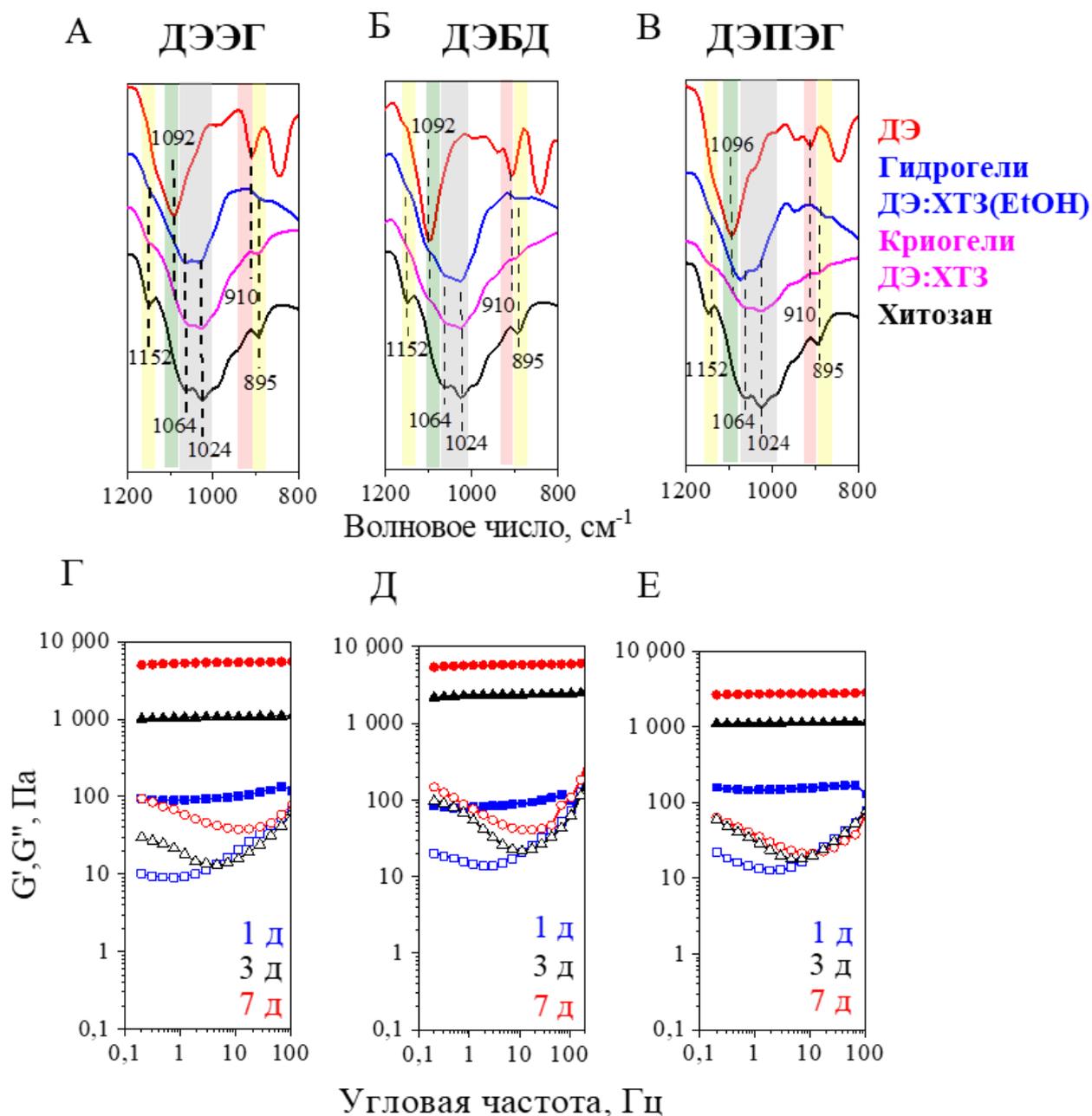


Рисунок 19 – ИК-Фурье спектры криогелей и гидрогелей (EtOH) ДЭ:ХТЗ 1:1, полученных в солянокислых растворах при рН 5.5 сшивкой ДЭЭГ (А), ДЭБД (Б) и ДЭПЭГ (В). Спектры хитозана и ДЭ приведены для сравнения. Частотные зависимости модулей накопления ( $G'$ , заполненные символы) и потерь ( $G''$ , пустые символы) через один (1д), три (3д) и семь (7д) дней после добавления ДЭЭГ (Г), ДЭБД (Д) и ДЭПЭГ (Е) в солянокислые растворы хитозана

Изменения в исследуемой области ИК-спектров в случае гидрогелей и криогелей хитозана, сшитых ДЭЭГ и ДЭБД, менее заметны (рисунки 19А и Б) из-

за меньшей молекулярной массы и, соответственно, более низкого массового % этих сшивающих реагентов в реакционных смесях. При этом стоит отметить, что, несмотря на значительно более продолжительное время гелеобразования в системе ДЭБД:ХТЗ 1:1 при комнатной температуре (рисунок 15Б), её реологические свойства через 7 дней после добавления сшивающего реагента сопоставимы с системой ДЭЭГ:ХТЗ 1:1 со значительно более коротким временем гелеобразования (рисунки 19Г и Д).

Степень модификации хитозана (СМ) всеми тремя сшивающими реагентами (ДЭЭГ, ДЭБД и ДЭПЭГ) была рассчитана для криогелей, полученных при нескольких мольных соотношениях ДЭ:ХТЗ (рисунок 20). В результате установлено, что наиболее высокие значения СМ характерны для сшивки с применением ДЭБД. Значения СМ для ДЭБД при соотношении ДЭ:ХТЗ 1:1 значительно превышало значение, ожидаемое из стехиометрического взаимодействия через аминогруппы хитозана.

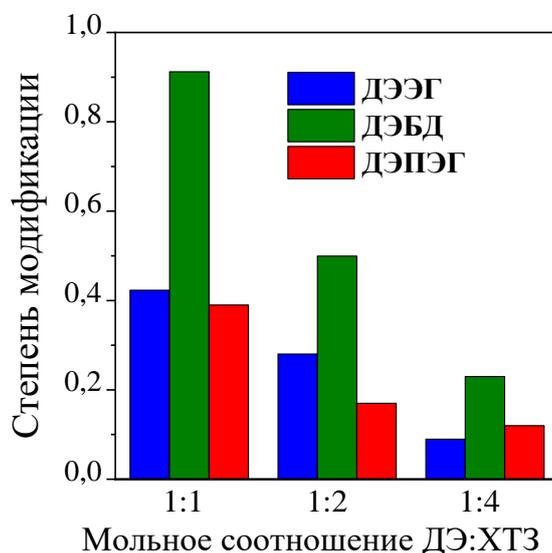


Рисунок 20 – Степень модификации криогелей хитозана сшивающими реагентами при различных мольных соотношениях ДЭ:ХТЗ

Хотя нельзя исключить возможность реакции ДЭ с хитозаном через гидроксильные группы (схема 3, реакция б), они обычно более

реакционноспособны в щелочных средах [135]. Наиболее вероятным объяснением наблюдаемого повышения СМ является олигомеризация ДЭБД при прививке в боковую цепь (схема 4). Возможность этой побочной реакции именно в случае ДЭБД может быть связана с меньшей растворимостью ДЭБД в воде ( $\log_{10}WS = -0.183$  и  $0.47$  для ДЭБД и ДЭЭГ соответственно [164,165]) и образованием микрофазы, в которой олигомеризация ДЭБД конкурирует с целевой реакцией сшивки через аминогруппы.

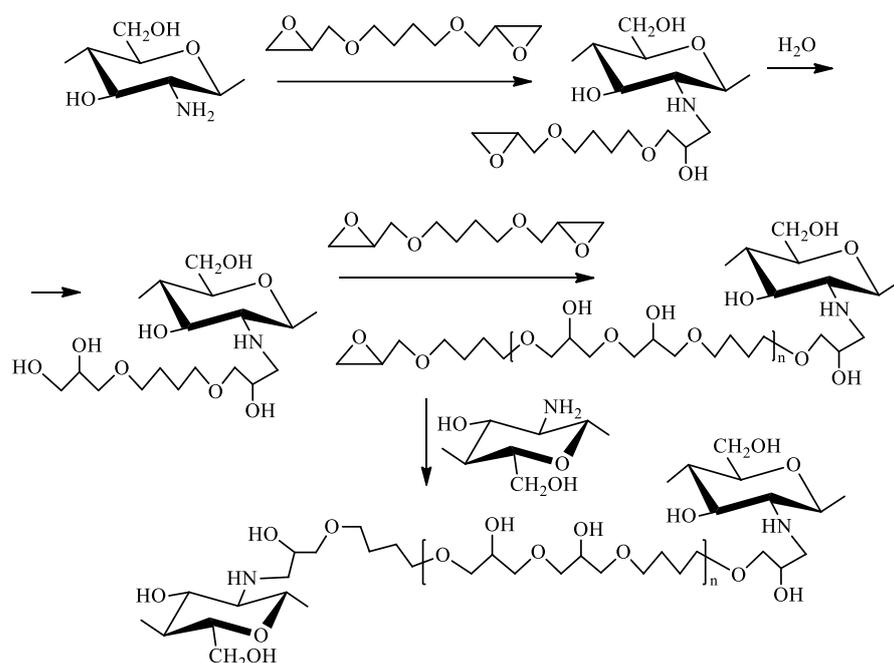


Схема 4 – Возможная побочная реакция олигомеризации ДЭБД при сшивке хитозана

Для всех ДЭ в исследованном ряду можно отметить следующее: несмотря на более низкую реакционную способность при отрицательных температурах, непрореагировавшие эпоксидные группы, которые потенциально могли бы быть ответственными за цитотоксичность полученных материалов, не были идентифицированы в ИК-Фурье спектрах криогелей (рисунки 19А–В).

## ГЛАВА 4 ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ НА МОРФОЛОГИЮ И СВОЙСТВА КРИОГЕЛЕЙ ХИТОЗАНА, СШИТЫХ ДИГЛИЦИДИЛОВЫМИ ЭФИРАМИ

### 4.1 Морфология, набухание и проницаемость криогелей хитозана

Хотя криогелирование является одним из эффективных подходов к созданию материалов с низким сопротивлением потоку жидкости, примеры монолитных криогелей на основе хитозана с хорошей проницаемостью немногочисленны [21,94,96,105,166–168] по сравнению с большим количеством работ, посвященных криогелям хитозана в целом. Теоретически гидродинамические свойства криогелей зависят от структуры пор [96] и плотности сшивки [52]. Так, проницаемость ранее описанных криогелей хитозана, сшитых ГА, увеличивалась с увеличением температуры криогелирования за счет образования более крупных пор [95] и с увеличением плотности сшивки за счет снижения степени набухания стенок пор [94].

В отличие от криогелей хитозана, сшитых ГА, проницаемость криогелей, сшитых ДЭ, уменьшается с увеличением степени сшивки и длины ДЭ (рисунок 21Б). Такая разница в свойствах криогелей может быть результатом особенностей морфологии и набухания криогелей в зависимости от типа сшивающего реагента. В процессе набухания криогелей макропоры быстро заполняются водой (условно несвязанная вода, свободно перемещающаяся в поровом пространстве), в то же время набухают и стенки пор за счет гидратации полимера или сшивок (связанная вода) [90]. Вода из макропор легко удаляется при сжатии криогеля, связанную воду можно удалить только в процессе сушки. Таким образом, для криогелей обычно определяют два вклада в степень набухания – набухание за счет макропор и за счет полимерной фазы. Поскольку гидратация ДЭ зависит от длины цепи и максимальна для ДЭПЭГ, увеличение степени модификации хитозана сшивающим реагентом приводит к результатам,

противоположным наблюдаемым при шшивке ГА: вклад набухания полимерной фазы в общую степень набухания увеличивается с увеличением степени шшивки (рисунок 21А). В результате, криогели, сшитые ДЭПЭГ, были проницаемыми только в диапазоне соотношений ДЭ:ХТЗ 1:8–1:20, тогда как проницаемость криогелей, сшитых ДЭЭГ, была достаточно высокой во всем интервале соотношений ДЭ:ХТЗ 1:1–1:20 (рисунок 21Б).

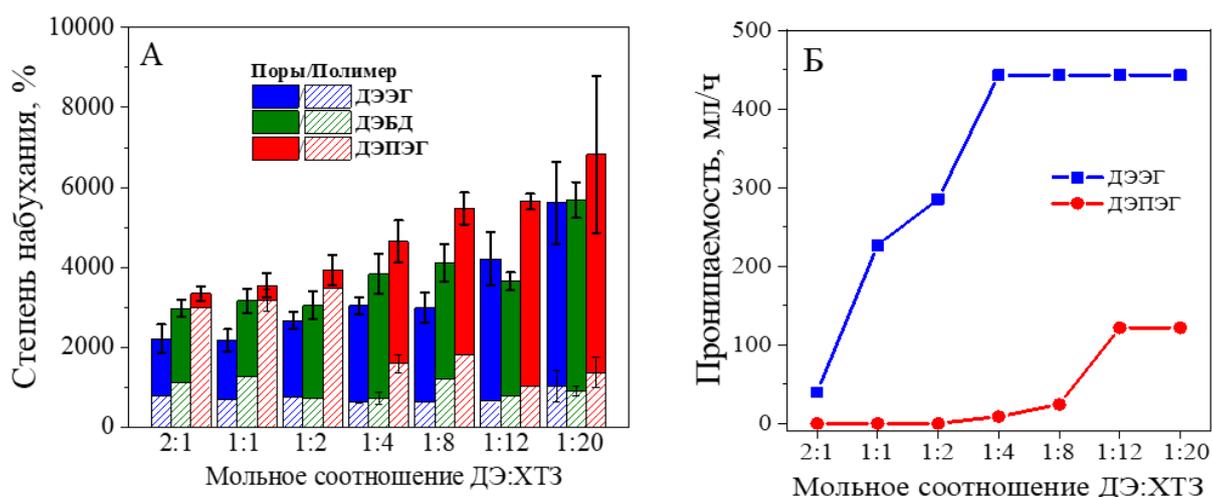


Рисунок 21 – Набухание (А) и проницаемость (Б) криогелей хитозана, сшитых ДЭЭГ, ДЭБД и ДЭПЭГ при различных мольных соотношениях ДЭ:ХТЗ

Низкая проницаемость криогелей, сшитых ДЭПЭГ, коррелирует с высокой степенью набухания полимерной фазы и незначительным вкладом в общее набухание свободной воды в макропорах до отношения ДЭПЭГ:ХТЗ 1:4. При низкой степени шшивки (ДЭПЭГ:ХТЗ 1:20) общая степень набухания составила  $6823 \pm 1963$  %, из которых 80 % приходится на вклад макропор, тогда как при отношении ДЭПЭГ:ХТЗ 1:1 вклад макропор в общую степень набухания составлял 10 %. Для криогеля ДЭЭГ:ХТЗ 1:1 – вклад макропор в степень набухания составлял 68 %. Таким образом, проницаемость криогелей сшитых, как ГА, так и ДЭ, повышалась с понижением степени набухания стенок пор, но отрицательная корреляция между степенью набухания и степенью шшивки для ДЭ отсутствовала, поскольку уменьшение набухания хитозана в результате шшивки частично

компенсировалось гидратацией и набуханием самих шивок. Для сравнения, проницаемость на уровне 400 мл/ч достигалась для криогелей хитозана, сшитых ГА, только при высокой степени сшивки 1:2.5 [95], тогда как для криогелей, сшитых ДЭЭГ, такая же проницаемость обеспечивалась при меньшей степени сшивки при соотношениях ДЭЭГ:ХТЗ 1:4–1:20 (рисунок 21Б).

Анализ размера пор, как основного фактора, влияющего на гидродинамические свойства криогелей, проводили только для проницаемых материалов, для которых наименьшая и наибольшая плотность сшивки соответствовали мольным соотношениям ДЭ:ХТЗ 1:20 и 1:4. Полученные лазерной конфокальной микроскопией изображения пористой структуры криогелей хитозана представлены на рисунке 22.

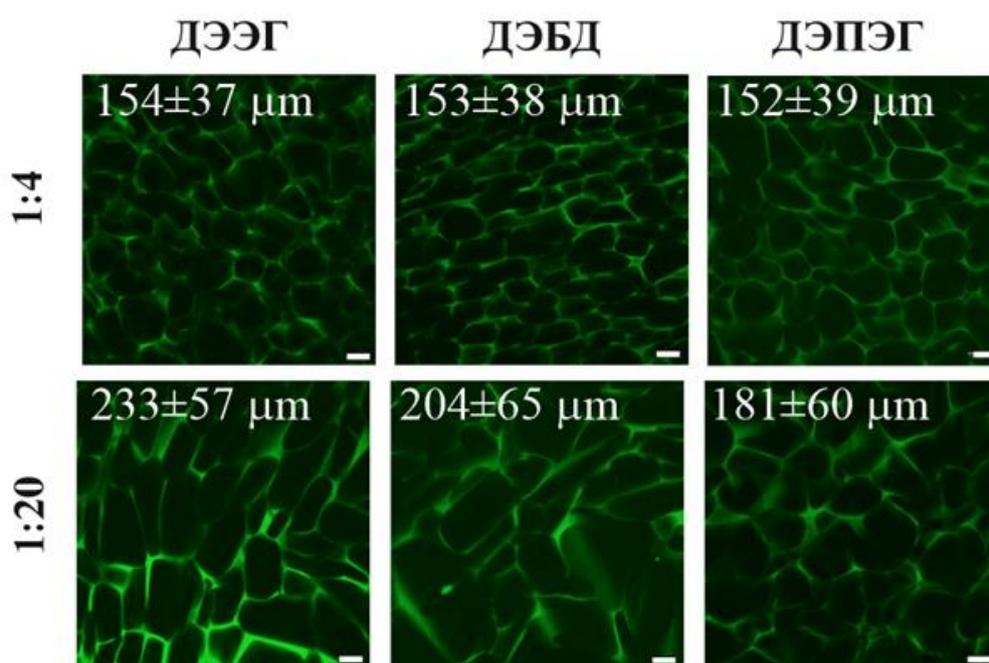


Рисунок 22 – Изображения поперечных срезов криогелей хитозана, полученные с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, и средние размеры пор в зависимости от сшивающего реагента и мольного соотношения ДЭ:ХТЗ при сшивке (1:4 и 1:20), масштабная линейка: 100 мкм

При высокой концентрации сшивающих реагентов (ДЭ:ХТЗ 1:4) средний размер пор во всех криогелях был близок к 150 мкм [169]. Повышение

проницаемости, несмотря на высокие степени набухания, для криогелей, сшитых ДЭ при отношении ДЭ:ХТЗ 1:20, можно связать с увеличением размера пор. Средний диаметр пор криогелей, сшитых ДЭ, варьировался от 181 до 233 мкм, что в среднем в 3-4 раза больше по сравнению с представленными в литературе криогелями хитозана, сшитыми ГА [12,94,95,100], и пористыми матрицами, полученными лиофилизацией растворов хитозана [72]. Наиболее вероятной причиной формирования с применением ДЭ более широкопористой структуры криогелей, чем это возможно при сшивке ГА, является низкая скорость гелеобразования. Время гелеобразования в растворах хитозан-ДЭ составляет от нескольких часов при ДЭ:ХТЗ 1:1 до нескольких десятков часов при низких степенях сшивки ДЭ:ХТЗ 1:20 (рисунок 13А). Медленное увеличение вязкости при замораживании растворов хитозан-ДЭ не препятствует кристаллизации растворителя и, таким образом, способствует формированию более крупных пор. Напротив, при добавлении ГА в растворы хитозана аналогичной концентрации образование геля происходит за минуты [46,47]. Поскольку резкое увеличение вязкости замороженного раствора ограничивает рост кристаллов льда, размер пор криогелей, сшитых ГА, несущественно меняется в зависимости от молекулярной массы полимера и температуры криогелирования и редко превышает 70 мкм [52,94,95].

Следует отметить, что поскольку вязкость растворов хитозана существенно зависит не только от концентрации и молекулярной массы полимера, но и от рН, ионной силы, анионной формы и степени деацетилирования [170–172], эти параметры необходимо строго контролировать в процессе получения криогелей.

#### **4.2 Механические свойства криогелей хитозана**

Чтобы установить, как длина цепи ДЭ и плотность сшивки влияют на механические свойства криогелей, записывали деформационные кривые при

одноосном сжатии набухших криогелей разного состава в цикле «нагрузка-разгрузка» (рисунок 23). Деформационные кривые имеют типичную для биологических тканей форму с тремя выраженными областями [173,174]: 1) линейная область упругих деформаций ( $\varepsilon = 0-15\%$ ) (рисунок 23А-1); 2) область сжатия пор с вытеснением свободной воды из порового пространства ( $\varepsilon \sim 15-55\%$ , соответствует минимальным изменениям нагрузки) (рисунок 23А-2); 3) область уплотнения стенок пор ( $\varepsilon > 55\%$ ) (рисунок 23А-3).

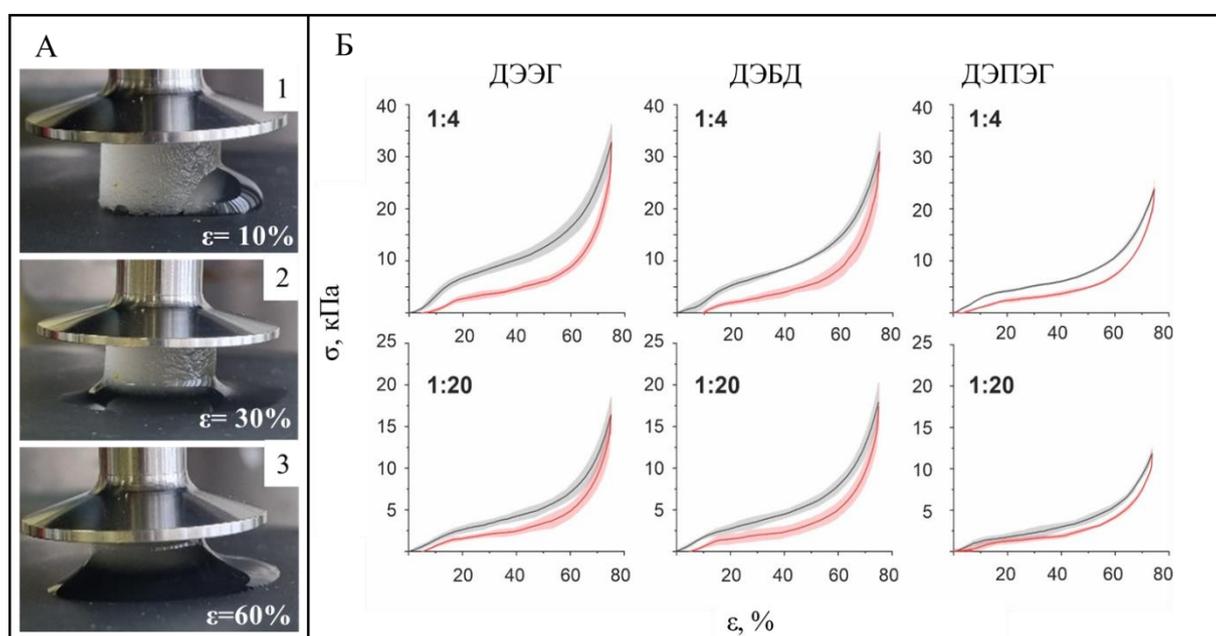


Рисунок 23 – Фотоизображение криогеля ДЭБД:ХТЗ 1:4 в процессе одноосного сжатия (А); деформационные кривые, записанные в цикле «нагрузки-разгрузки» при одноосном сжатии набухших криогелей хитозана, сшитых ДЭЭГ, ДЭБД и ДЭПЭГ при мольных соотношениях ДЭ:ХТЗ 1:4 и 1:20. Заполненные цветом области отражают доверительные интервалы (Б)

В зависимости от сферы применения для характеристики механических свойств криогелей используются различные параметры [23]. Хотя жесткость криогелей (модуль Юнга) иногда рассчитывают как по первому, так и по третьему участкам деформационных кривых [175], выбор диапазона линейаризации в некоторой степени субъективен, поскольку участки не имеют четких границ, что делает сравнение в рядах материалов неоднозначным. Нагрузка при сжатии

образца до достижения определенного уровня деформации и интегральные характеристики, такие как удельная потенциальная энергия деформации и гистерезис, являются более надежными параметрами для исследования влияния типа сшивающего реагента и плотности сшивки на механические свойства криогелей. На этом основании помимо модуля Юнга, который рассчитывали преимущественно для сравнения с литературными данными, из деформационных кривых рассчитывали удельную потенциальную энергию деформации; нагрузку при сжатии, требующуюся для деформации образца криогеля на 40 и 75%, и гистерезис, характеризующий необратимые потери энергии при деформации (рисунок 24). Все криогели демонстрировали высокую эластичность, то есть способность материала восстанавливать свою первоначальную форму после деформации. После снятия нагрузки вытесненная из криогеля вода поглощалась криогелем за счет капиллярных сил с восстановлением первоначальной высоты на 90–96 %. Максимальной эластичностью отличались криогели, сшитые ДЭПЭГ, восстанавливающие после снятия нагрузки первоначальную форму на 98–99 %. Эти криогели также характеризовались наименьшим гистерезисом за счет пластифицирующих свойств ПЭГ-сшивок, ослабляющих межмолекулярные водородные связи в хитозане, ответственные за высокую хрупкость материалов на его основе. Нужно отметить, что после набухания в равновесных условиях (избыток воды) восстановление формы было близким к 100 % для всех криогелей. Несмотря на то, что деформационные кривые записаны до  $\varepsilon = 75\%$ , предел прочности достигнут не был: после сжатия до  $\varepsilon \sim 95\%$  криогели, полученные при отношениях ДЭ:ХТЗ 1:4–1:20, сохраняли целостность структуры.

Варьируя длину цепи ДЭ и степень сшивки (ДЭ:ХТЗ 1:4 и 1:20), мы получили криогели с модулем Юнга ( $E$ ) от  $10.4 \pm 0.8$  до  $41 \pm 3$  кПа (рисунок 24А), удельной потенциальной энергией деформации ( $U$ ) от  $2.7 \pm 0.5$  до  $8.3 \pm 1.3$  кДж/м<sup>3</sup> (рисунок 24Б) и нагрузкой при сжатии до  $\varepsilon = 75\%$  от  $11 \pm 2$  до  $33 \pm 4$  кПа (рисунок 24Г).

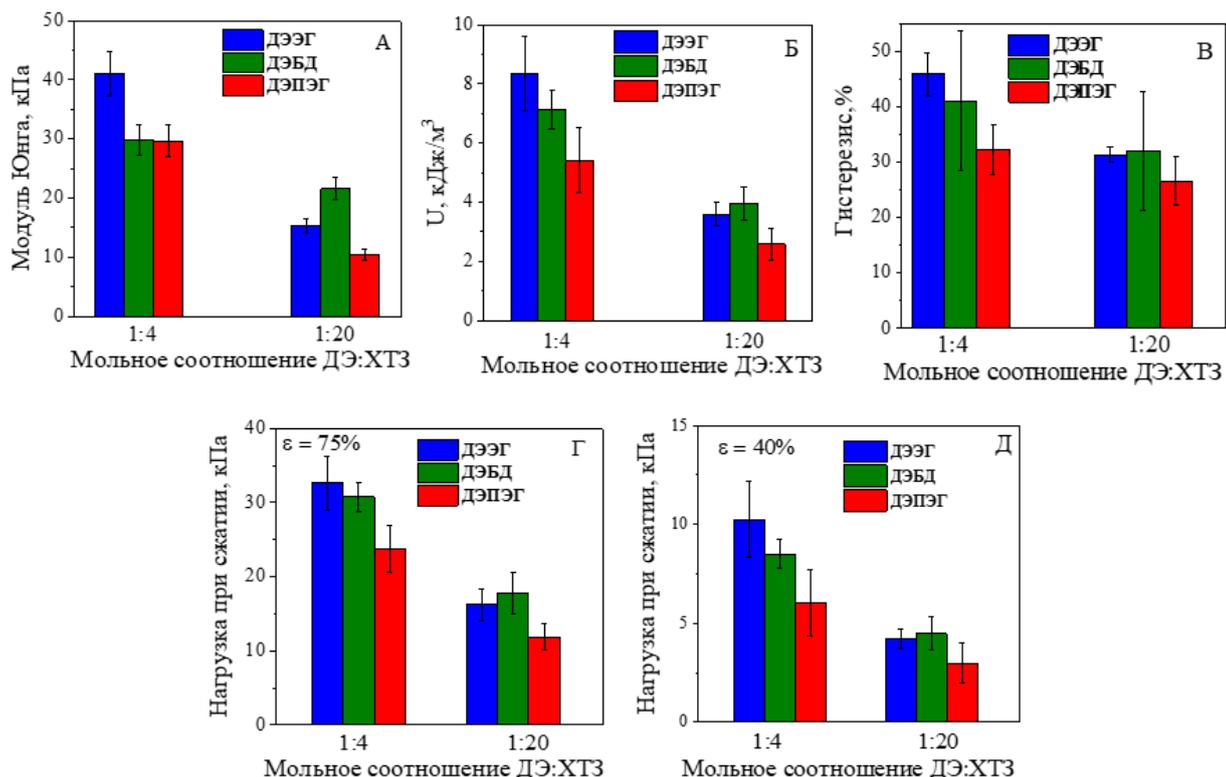


Рисунок 24 –Механические свойства криогелей хитозана, сшитых ДЭЭГ, ДЭБД и ДЭПЭГ при мольном соотношении ДЭ:ХТЗ 1:4 и 1:20: модуль Юнга (А), удельная потенциальная энергия деформации (Б), гистерезис (В) и нагрузка при сжатии криогеля при деформации ( $\epsilon$ ) 75 % (Г) и 40 % (Д)

При высокой степени сшивки (ДЭ:ХТЗ 1:4) значения удельной потенциальной энергии деформации (рисунок 24Б), гистерезиса (рисунок 24В) и нагрузки при сжатии (рисунок 24 Г, Д) уменьшались с увеличением длины цепи сшивающего реагента, что свидетельствует о том, что повышение эластичности достигалось за счет снижения механических свойств криогелей [169]. Самый жесткий криогель в ряду ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 характеризовался нагрузкой при сжатии ( $\epsilon = 75\%$ )  $33 \pm 4$  кПа и модулем Юнга  $41 \pm 3$  кПа, что выше, чем для криогелей, сшитых ГА при мольном соотношении ГА: ХТЗ 1:3–1:5 [100]. Однако более высокие механические свойства криогеля ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 сочетались с хорошей эластичностью, нехарактерной для криогелей, полученных с применением ГА при таких высоких степенях сшивки. Следует также отметить, что криогели, сшитые ДЭБД, характеризовались наибольшим стандартным отклонением гистерезиса и

более высокой вероятностью образования трещин при максимальной нагрузке. Мы предполагаем, что это может быть результатом неравномерной структуры полимерной сетки, формирующейся при олигомеризации ДЭБД (схема 4). При низкой степени сшивки (ДЭ:ХТЗ 1:20) корреляция между механическими свойствами криогелей и длиной цепи сшивающего реагента была менее выраженной. Здесь можно отметить, что также как и при высокой степени сшивки наиболее высокой эластичностью и наименьшим гистерезисом характеризовался криогель, сшитый ДЭПЭГ. Корреляционный анализ с применением матрицы Пирсона показал, что нагрузка при сжатии ( $\sigma-75$ ) криогелей хитозана зависит от размера пор, длины цепи сшивающего реагента, но наиболее сильно коррелирует с мольным соотношением ХТЗ:ДЭ ( $r = -0.85$ ) и степенью набухания ( $r = -0.89$ ) (таблица 2).

Таблица 2 – Корреляционная матрица Пирсона: анализ взаимосвязи между составом, структурой и свойствами криогелей хитозана, сшитых диглицидиловыми эфирами гликолей

	$N_c$	ХТЗ:ДЭ	d	ST	SW	ПМ	Hys	$\sigma-75$
$N_c$	1	0.034	-0.253	0.278	0.737	0.538	-0.428	-0.406
ХТЗ:ДЭ	0.034	1	0.892	0.870	0.262	0.767	-0.583	-0.853
d	-0.253	0.892	1	0.779	0.146	0.570	-0.479	-0.698
ST	0.278	0.870	0.779	1	0.593	0.844	-0.677	-0.899
SW	0.737	0.262	0.147	0.593	1	0.640	-0.541	-0.534
ПМ	0.538	0.767	0.570	0.847	0.639	1	-0.747	-0.853
Hys	-0.428	-0.583	-0.479	-0.677	-0.541	-0.747	1	0.755
$\sigma-75$	-0.406	-0.853	-0.698	-0.899	-0.534	-0.853	0.755	1

\* $N_c$  – число атомов углерода в сшивающем реагенте (длина цепи ДЭ),  $N=8, 10$  и  $23$  для ДЭЭГ, ДЭБД и ДЭПЭГ соответственно); ХТЗ:ДЭ (мольное соотношение ХТЗ:ДЭ,  $4$  – высокая плотность сшивки,  $20$  – низкая плотность сшивки); d – диаметр пор; ST (общее набухание); SW (набухание за счет макропор); ПМ – глубина ферментативного гидролиза, достигаемая за  $24$  ч; Hys (гистерезис);  $\sigma-75$  (нагрузка при деформации на сжатие  $75\%$ )

### 4.3 Устойчивость криогелей хитозана к ферментативному гидролизу

Устойчивость хитозана к ферментативному гидролизу является важным фактором, определяющим скорость биорезорбции хитозановых имплантатов [176] и скорость высвобождения лекарственных препаратов *in vivo* из гидрогелевых пленок [177] и других форм направленной доставки лекарственных средств. Хитозан с различной степенью ацетилирования может быть гидролизован различными специфическими и неспецифическими ферментами [130], включая эндоглюкозаминидазу, которая присутствует в сыворотке крови и лейкоцитах человека и проявляет хитиназную активность [178,179]. Как уже отмечалось в литературном обзоре, тип и плотность сшивки в процессе получения на основе хитозана материалов разного назначения могут существенно влиять на скорость их ферментативной деградации.

Для предварительной оценки влияния способа получения на устойчивость криогелей хитозана к ферментативному гидролизу исследовали глубину гидролиза (потерю массы) криогелей под действием фермента  $\beta$ -глюканазы за 24 ч в зависимости от длины цепи ДЭ и степени сшивки (ДЭ:ХТЗ 1:4 и 1:20).  $\beta$ -Глюканаза относится к целлюлазному комплексу, который по типу гидролитической активности подразделяется на эндо-1,4- $\beta$ -глюканазу, гидролизующую  $\beta$ -1,4-глюкозидную связь вдоль полимерной цепи, экзо-1,4- $\beta$ -D-глюканазу, отщепляющую целлобиозу с невосстановленных концов целлюлозной цепи и  $\beta$ -глюканазу, расщепляющую целлобиозу до двух глюкозидных единиц [180,181]. Анализ продуктов гидролиза большинства целлюлаз из наиболее известных штаммов показал эндоактивную природу фермента по отношению к хитозану [182].  $\beta$ -Глюканаза, используемая в данной работе в качестве модельного фермента, продуцируется мицелиальными грибами *Myceliophthora fergusii* и содержит комплекс ферментов, основным из которых является  $\beta$ -глюканаза (эндо-

$\beta$ -1,4-глюканаза). Согласно работе [183], ферментативный препарат, полученный из данного штамма грибов, проявляет хитиназную и хитозаназную активность.

На рисунке 25А показано, что для криогелей ряда ДЭ:ХТЗ 1:4 глубина гидролиза возрастала с увеличением длины цепи ДЭ при максимальной и минимальной степени деградации  $57 \pm 12\%$  и  $29 \pm 3\%$  в случае сшивки ДЭПЭГ и ДЭЭГ соответственно. При низкой плотности сшивки (ДЭ : ХТЗ 1:20) глубина гидролиза была в среднем в два раза выше и достигала  $95 \pm 2\%$  для ДЭПЭГ : ХТЗ.

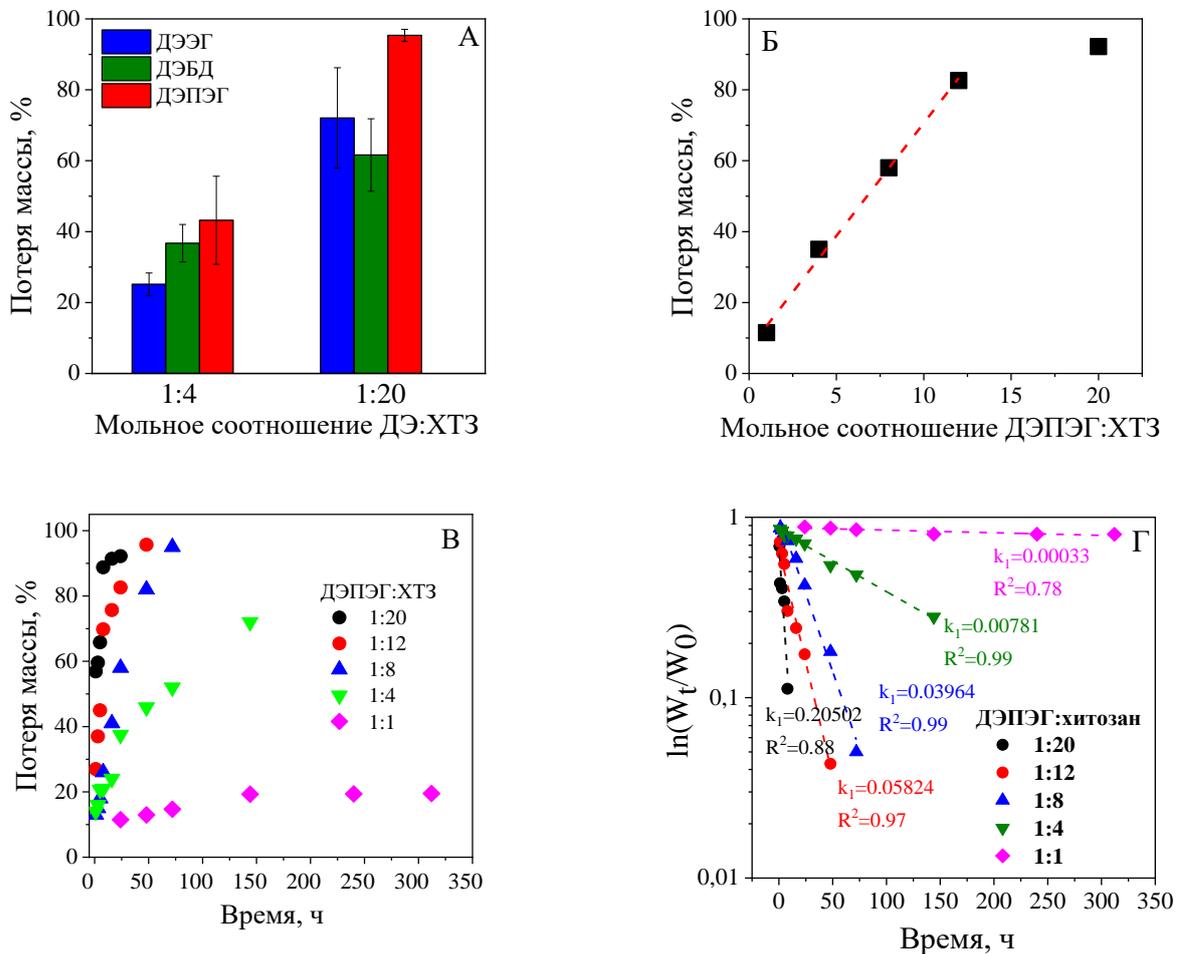


Рисунок 25 – Ферментативный гидролиз криогелей ДЭ:ХТЗ  $\beta$ -глюканазой (330 ед/мл, рН 7.4,  $T = +37^\circ\text{C}$ ): потеря массы (глубина гидролиза) за 24 ч (А) и ее зависимость от отношения ДЭ:ХТЗ при сшивке ДЭПЭГ (Б); кинетические кривые ферментативной деградации криогелей ДЭПЭГ:ХТЗ (В, Г) с преобразованием в линейную форму по уравнению кинетики псевдопервого порядка (Г)

Глубина гидролиза криогеля ДЭБД:ХТЗ 1:4 была значительно ниже ( $37 \pm 5 \%$ ) по сравнению с пленкой хитозана, сшитой при соотношениях ДЭБД:ХТЗ 1:2–5:1 в изопропанолe и полностью разлагающейся хитозаназой за 24 ч аналогично несшитой пленке [70]. Этот факт подтверждает, что в известных из открытых публикаций работах сшивку хитозана ДЭ проводили в неподходящих условиях.

Для нахождения корреляции между глубиной ферментативной деградации, условиями сшивки и характеристиками криогелей, были определены коэффициенты корреляции Пирсона для следующих параметров: длина цепи сшивающего реагента, мольное соотношение ХТЗ:ДЭ (4:1 и 20:1), размер пор, общая степень набухания, нагрузка при сжатии до  $\varepsilon = 75\%$  (таблица 2). Установлено, что на восприимчивость криогелей к ферментативному гидролизу влияют все эти параметры, но наибольшее влияние оказывают мольное соотношение ДЭ:ХТЗ ( $r = 0.77$ ), степень набухания ( $r = 0.84$ ) и нагрузка при сжатии ( $r = -0.85$ ). Так, максимальная глубина деградации при обеих степенях сшивки наблюдалась для наиболее эластичных криогелей, сшитых ДЭПЭГ, с наибольшей в ряду степенью набухания и минимальными значениями удельной потенциальной энергией деформации и нагрузки при сжатии. При этом ожидаемо глубина гидролиза снижалась с увеличением степени сшивки (уменьшением отношения ХТЗ:ДЭ).

Для достижения максимального широкого диапазона изменения глубины и скорости ферментативного гидролиза соотношение ДЭПЭГ:ХТЗ варьировали от 1:1 до 1:20. В зависимости от плотности сшивки криогели ДЭПЭГ:ХТЗ разлагались  $\beta$ -глюканиазой за 24 ч на 11–95 % (рисунок 25Б), линейная корреляция между глубиной гидролиза и плотностью сшивки наблюдалась в диапазоне мольных соотношений ДЭПЭГ:ХТЗ от 1:1 до 1:12. Кинетика ферментативной деградации криогелей ДЭПЭГ:ХТЗ (рисунок 25В), сшитых ДЭПЭГ, хорошо описывается уравнением реакций псевдопервого порядка (рисунок 25Г). При увеличении

концентрации сшивающего реагента в 20 раз скорость деградации полученного криогеля снизилась в 612 раз (таблица 3), что делает устойчивость к ферментативному гидролизу параметром, наиболее чувствительным среди оцениваемых параметров к условиям получения криогелей хитозана [169].

Таблица 3 – Константы скорости ферментативной деградации криогелей ДЭПЭГ:ХТЗ  $\beta$ -глюканазой (активность  $\beta$ -глюканазы – 330 ед/мл, рН 7.4, T= +37 °C)

Мольное соотношение ДЭПЭГ:ХТЗ	$k_1(1/ч)$	$R^2$
1:1	0.00033	0.78
1:4	0.00781	0.99
1:8	0.03964	0.99
1:12	0.05824	0.97
1:20	0.20502	0.88

Повышение устойчивости криогелей хитозана к ферментативному гидролизу с ростом степени сшивки можно объяснить участием в реакции аминогрупп хитозана, в результате чего уменьшается количество структурных фрагментов, которые может атаковать фермент. Низкая и плохо контролируемая устойчивость к ферментативному гидролизу пленок хитозана, сшитых ДЭБД и ДЭПЭГ, отмеченная в работах [70,133], вероятно является результатом низкой степени сшивки в гетерогенных условиях в метаноле [70] или в растворе уксусной кислоты [133]. Таким образом, разработанный нами способ получения криогелей хитозана с использованием ДЭ позволяет эффективно управлять скоростью ферментативной деградации криогелей, варьируя длину цепи ДЭ и степень сшивки, что может быть использовано в дизайне материалов биомедицинского назначения с настраиваемой скоростью биорезорбции.

## ГЛАВА 5 ПРИМЕНЕНИЕ КРИОГЕЛЕЙ ХИТОЗАНА

### 5.1 Сорбционные свойства монолитных криогелей хитозана

Одной из важнейших областей применения хитозана является очистка сточных вод и питьевой воды. Благодаря наличию первичных аминогрупп, хитозан является высокоэффективным сорбентом для различных типов поллютантов, включая ионы тяжелых металлов, красители и растворенные органические вещества. Чтобы обеспечить применимость в динамических условиях сорбции при  $\text{pH} < 5$  и избежать возникновения сопротивления на колонке, гранулы хитозана должны иметь относительно большие размеры и низкую степень набухания [184]. Отрицательной стороной высокой степени сшивки, необходимой для снижения степени набухания, является снижение сорбционной емкости за счет участия в процессе сшивки аминогрупп хитозана. Так, например, сорбционная ёмкость гранул хитозана, сшитых ДЭЭГ в щелочной среде, по отношению к кислотным красителям была в 1.5 раза меньше, чем у исходного хитозана [185]. Еще одной проблемой является низкая скорость диффузии абсорбата внутри жесткой полимерной матрицы, что приводит к значительному снижению динамической сорбционной емкости с увеличением размера гранул сорбента.

Основное преимущество монолитных широкопористых сорбентов перед гранулированными сорбентами такого же состава заключается в том, что за счет тонких стенок пор значительно снижаются ограничения, связанные с внутренней диффузией адсорбата. Достичь аналогичного эффекта при применении гелевых сорбентов можно только за счет уменьшения размера гранул, что неизбежно приводит к росту сопротивления на колонке. Однако для применения в сорбционных колонках монолитные широкопористые сорбенты должны быть проницаемыми при высоких скоростях потока, иметь при минимальной толщине стенок достаточную механическую прочность, чтобы противостоять деформациям

при давлении потока жидкости и сохранять постоянство объема в процессе сорбции во избежание формирования пристеночных каналов и снижения эффективности сорбции с ростом степени заполнения сорбента.

Исходя из первых двух требований и результатов исследования зависимостей между составом и свойствами криогелей хитозана, приведенных в главе 4, наиболее предпочтительным сшивающим реагентом для получения сорбционных материалов представляется ДЭЭГ. В качестве модельного адсорбата мы выбрали относящийся к группе антрахиноновых красителей ализариновый красный S (АК) (рисунок 26А), который широко используется в текстильной промышленности и устойчив к деградации [186]. Очистка сточных вод текстильной промышленности является важной проблемой во многих странах из-за высокой устойчивости красителей к аэробному разложению и окислителям [35]. Существуют различные формы сорбентов на основе хитозана для извлечения красителей – гранулы, микросферы, мембраны, волокна и т.п. [35,187,188], однако, насколько нам известно, возможности применения криогелей хитозана для извлечения красителей в динамических условиях сорбции не исследовались.

Сорбционные свойства по отношению к АК криогелей хитозана, сшитых ДЭЭГ при различных мольных соотношениях ДЭ:ХТЗ, были предварительно исследованы в статическом режиме при рН 5.6. На рисунке 26Б показано, что криогели хитозана имеют высокую сорбционную емкость, которая повышается с 416 до 983 мг/г с уменьшением степени сшивки ДЭ:ХТЗ от 1:1 до 1:20 соответственно. Поскольку АК сорбируется на хитозане по электростатическому механизму за счет образования ионной связи между аминогруппой и сульфогруппой, изменяется степень набухания полимерной фазы сорбента, что сопровождается изменением объема. Эти изменения тем более значительны, чем ниже степень сшивки. Так, объем сорбента ДЭЭГ:ХТЗ 1:20 с максимальной сорбционной емкостью уменьшался на 53 % при величине сорбции 387 мг/г (рисунок 26В). В результате такого значительного изменения объема в процессе

сорбции, монолитный материал перестает прилегать к стенкам колонки и эффективность сорбции резко падает. С увеличением степени сшивки изменения объема при сорбции становятся менее значительными и для криогеля ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 не превышают 10% при величине сорбции 386 мг/г.

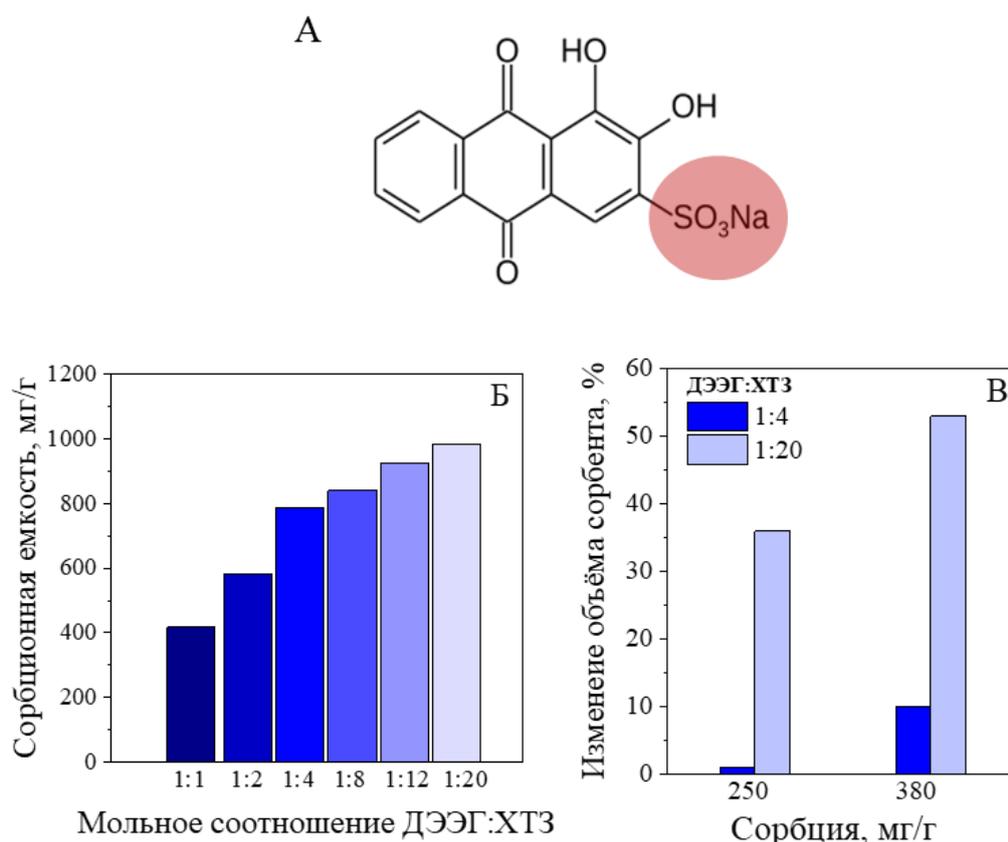


Рисунок 26 – Структурная формула красителя ализаринового красного S (АК) (А); сорбционная емкость криогелей ДЭЭГ:ХТЗ по красителю АК (Б) при следующих условиях сорбции: исходная концентрация АК 1000 мг/л, Т:Ж 1:1000, рН = 5.6, время контакта – 24 ч; изменение объема криогелей ДЭЭГ:ХТЗ, сшитых при мольном соотношении 1:4 и 1:20, после сорбции красителя АК при величине сорбции 250 и 380 мг/г (В)

Влияние рН на эффективность извлечения АК исследовали в широком диапазоне рН 2–10 на криогеле ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 (рисунок 27А). Вследствие того, что хитозан является слабым основанием с рК<sub>а</sub> 6.5–6.7, а сульфогруппа АК ионизирована во всем диапазоне рН, эффективность извлечения АК была

постоянной при рН 2–8 и составила 95–97 %. При рН >8, т.е. при полной депротонизации аминогруппы хитозана, электростатические взаимодействия между сорбентом и АК ослабевали и эффективность извлечения падала до 42 % при рН 10. Таким образом, в широком диапазоне рН криогель ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 может применяться для практически полного извлечения красителя АК, даже при его высокой исходной концентрации в растворе.

Высокая аффинность криогеля ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 к АК подтверждается формой изотермы сорбции (рисунок 27Б), которая хорошо описывается с применением модели Ленгмюра со следующими параметрами:  $Q_{\max}$  (максимальная сорбционная емкость) – 803 мг/г,  $K_L$  (константа Ленгмюра) – 0.18 л/г. Сорбционная емкость криогеля ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 существенно выше по сравнению с емкостью большинства приведенных в литературе материалов для сорбции АК. Например, сорбционная емкость магнетита с хитозановым покрытием составила 40.12 мг/г [189], гранул хитозана, импрегнированных ионной жидкостью Aliquat-336 – 127 мг/г [190], оксида графена и графитового порошка 88.50 мг/г и 34.13 мг/г соответственно [191].

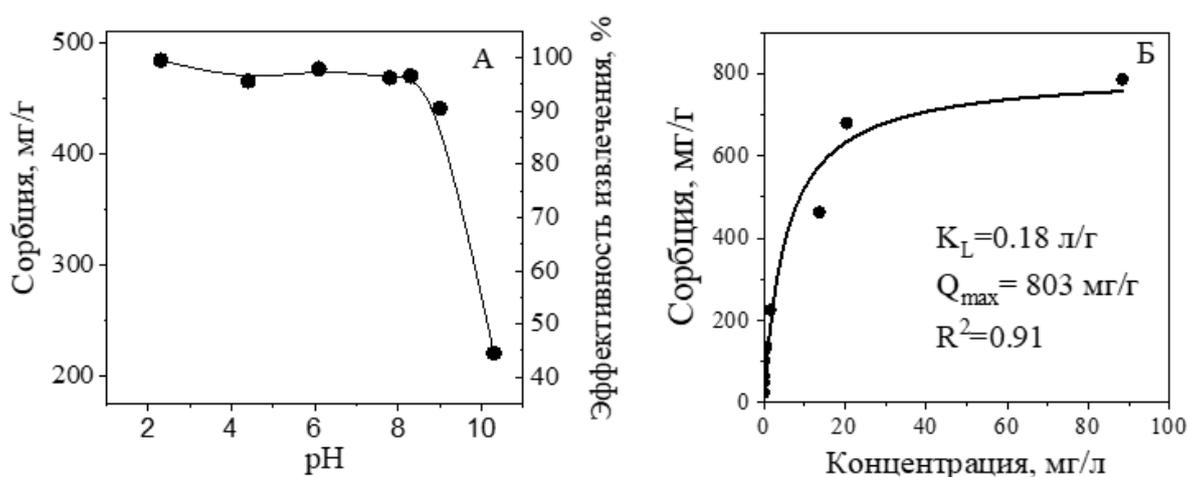


Рисунок 27 – Зависимость сорбции и эффективности извлечения красителя АК от рН при исходной концентрации АК 500 мг/л (А) и изотерма сорбции АК при рН = 5.6 (Б) на криогеле ДЭЭГ:ХТЗ 1:4. Условия сорбции: Т:Ж 1:1000, время контакта – 24 ч, Т = +25 °С

Сорбцию АК в динамическом режиме исследовали на монолитном сорбенте ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 при скорости потока 20 к.о./ч из раствора с концентрацией АК 20 мг/л (рисунок 28). На выходной кривой сорбции до проскока наблюдается горизонтальный участок с эффективностью извлечения АК – 100%. Эффективную динамическую сорбционную емкость рассчитывали для точки, соответствующей проскоку 10 % от начальной концентрации красителя (концентрация АК 2 мг/л на выходе из колонки), она составила 283 мг/г.

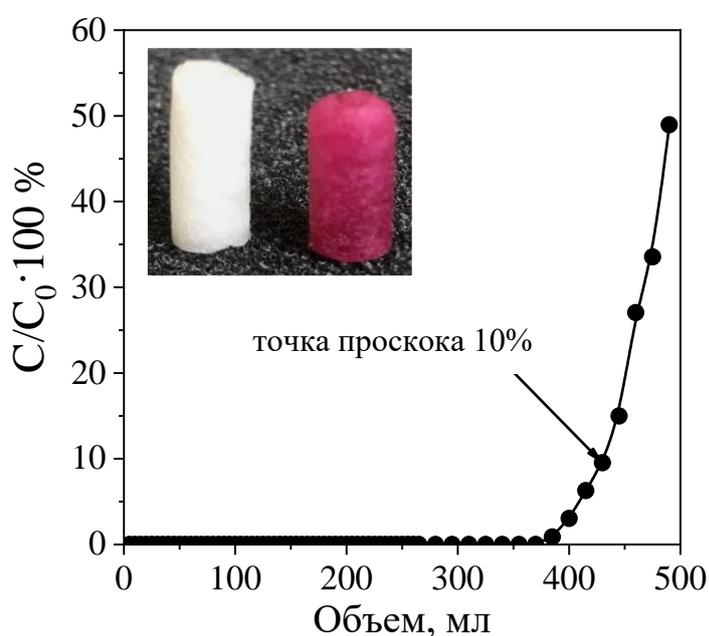


Рисунок 28 – Выходная кривая сорбции АК на монолитном криогеле ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 (внутренний диаметр колонки – 0.48 см, высота слоя – 6 см), концентрация АК – 20 мг/л, скорость потока – 20 к.о./ч, рН = 5.6. Вставка: фотоизображение фрагмента криогеля до и после сорбции

Наиболее вероятной причиной большой разницы в значениях динамической и статической сорбционной емкости является изменение объема монолитного сорбента (Рисунок 26 В), в результате чего нарушается эффективный транспорт абсорбата через весь объем пористой структуры монолита, и эффективность сорбции резко падает. Несмотря на то, что величина эффективной динамической

сорбционной емкости составляет 35 % от полной статической сорбционной емкости, она выше значений емкостей по АК, приведенных в литературе для других сорбентов [189–191], что подтверждает перспективность применения криогелей для очистки вод от этого типа загрязнителей.

Возможность регенерировать сорбент и использовать его в нескольких циклах важна для практического применения, особенно учитывая стоимость материалов на основе хитозана. Известно, что щелочные растворы обеспечивают наибольшую эффективность элюирования кислотных красителей после сорбции на хитозановых сорбентах [192]. Рисунок 29А показывает, что эффективность десорбции АК увеличивается с концентрацией NaOH в диапазоне 0.01–0.3 М и достигает 70 %. Применение криогелей в нескольких последовательных циклах сорбции/элюирования показано на рисунке 29Б: эффективность извлечения АК из раствора с концентрацией 20 мг/л сохранялась на уровне 100 % в трех циклах при эффективности элюирования 70–80 %.

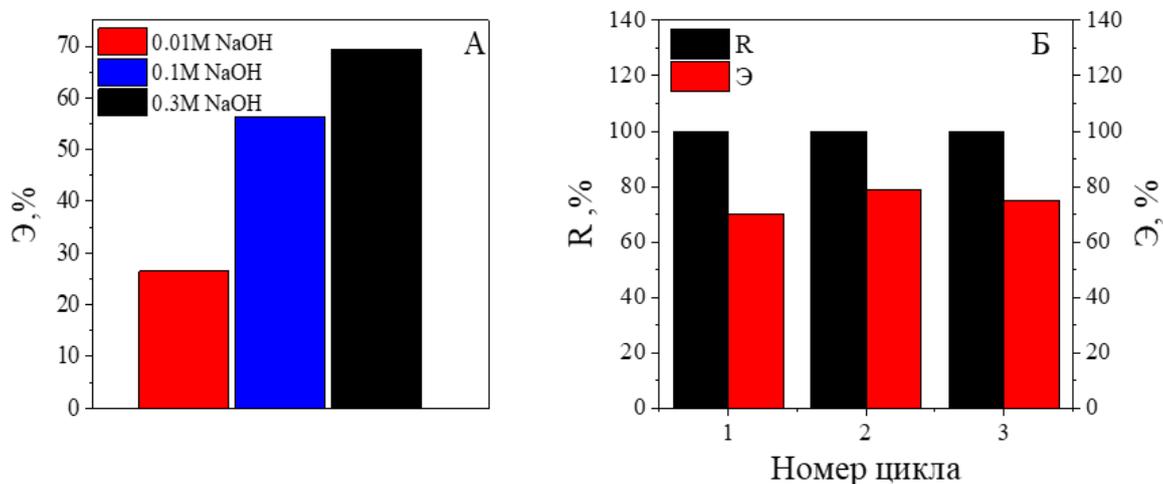


Рисунок 29 – Эффективность извлечения (R) на криогеле ДЭЭГ:ХТЗ 1: 4 и последующего элюирования (Э) красителя АК растворами NaOH: в зависимости от концентрации NaOH при  $R > 99\%$  (А) и номера цикла при концентрации NaOH 0.3 моль/л (Б). Условия элюирования: Т:Ж 1:10, время контакта – 2 ч,  $T = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$

## 5.2 Применение криогелей хитозана в качестве носителей катализаторов

Большой интерес к применению ковалентно сшитых ионогенных полимеров в качестве носителей наночастиц металлов в гетерогенном катализе определяется возможностью легко контролировать содержание металла в грануле и получать металлические наночастицы непосредственно в полимерной матрице путем восстановления предварительно сорбированных ионов металлов [193,194]. В качестве перспективных носителей металлических катализаторов наряду с синтетическими полимерами рассматривается хитозан [195–198], существенное преимущество которого для получения композитных металл-содержащих катализаторов заключается в том, что даже в немодифицированном виде он хорошо сорбирует ионы большинства переходных и благородных металлов.

Для получения на основе криогелей хитозана Pd(0)-содержащих композитных катализаторов ионы Pd(II) сорбировали из солянокислого раствора на дисках криогелей, полученных сшивкой ДЭЭГ, ДЭБД, ДЭПЭГ при мольном отношении ДЭ:ХТЗ 1:4, и затем восстанавливали боргидридом натрия. Высокая аффинность хитозана к ионам благородных металлов обеспечивает количественное извлечение ионов Pd(II) из разбавленных растворов, что позволяет получать материалы с содержанием палладия до 100 мг/г без использования на стадии сорбции избытка PdCl<sub>2</sub>. Вместе с тем известно, что максимальную эффективность в гетерогенном катализе демонстрируют материалы, в которых наночастицы металла располагаются на поверхности гранул [193,198], что делает полную загрузку носителей палладием в соответствии с их сорбционной емкостью нецелесообразной. После сорбции ионов Pd(II), их восстановления до Pd(0) и сушки на воздухе материалы сохраняли пористую структуру (рисунок 30).

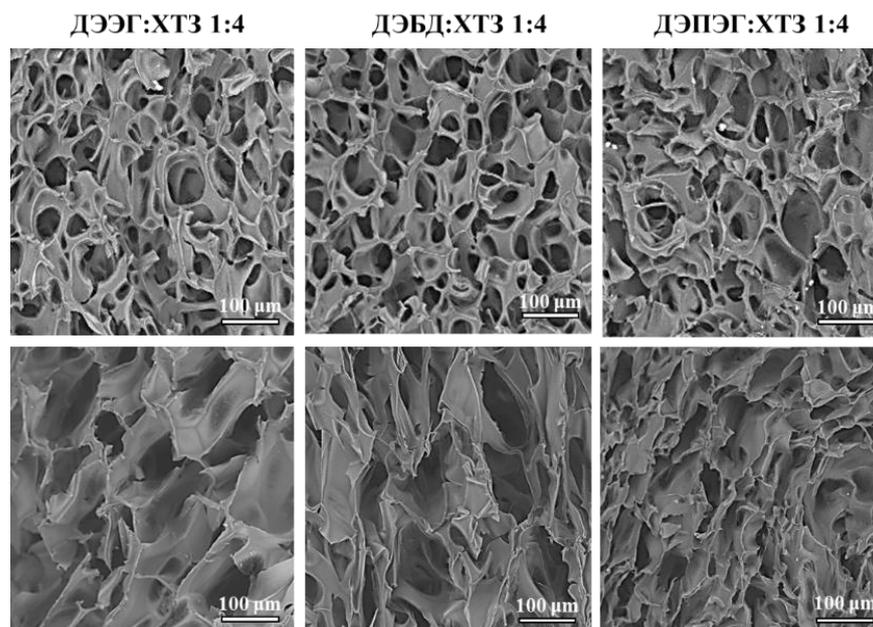


Рисунок 30 – СЭМ-изображения криогелей ДЭ:ХТЗ 1:4/Pd(0)

Поскольку ранее мы показали, что для непористых гранул хитозана и его производных заметное падение эффективности катализатора наблюдается при содержании палладия ниже 0.09 % [184], в данном исследовании содержание палладия для всех матриц фиксировали на уровне 1.5 %, надежно обеспечивающем высокую каталитическую активность. Таким образом, разница в эффективности композитных катализаторов будет определяться преимущественно характеристиками полимерной матрицы.

На рисунке 31А представлены результаты исследования кинетики конверсии пара-нитрофенола в реакции восстановления боргидридом натрия (схема 5) в зависимости от носителя палладиевого катализатора.

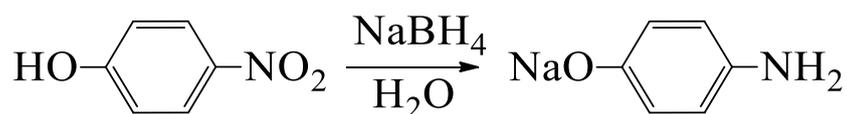


Схема 5 – Реакция восстановления пара-нитрофенола боргидридом натрия

Из рассчитанных на основании полученных данных констант скоростей реакции (рисунок 31Б, таблица 4) можно сделать вывод, что эффективность катализатора уменьшается в ряду матриц ДЭЭГ:ХТЗ > ДЭБД:ХТЗ > ДЭПЭГ:ХТЗ. Этот ряд соответствует увеличению степени набухания криогелей, в том числе, в значительной степени за счет повышения степени набухания полимерной фазы (рисунок 32А). Высокая степень набухания криогелей ДЭПЭГ:ХТЗ определяется более высоким массовым % гидрофильного сшивающего реагента в ряду при постоянном мольном отношении ДЭ:ХТЗ.

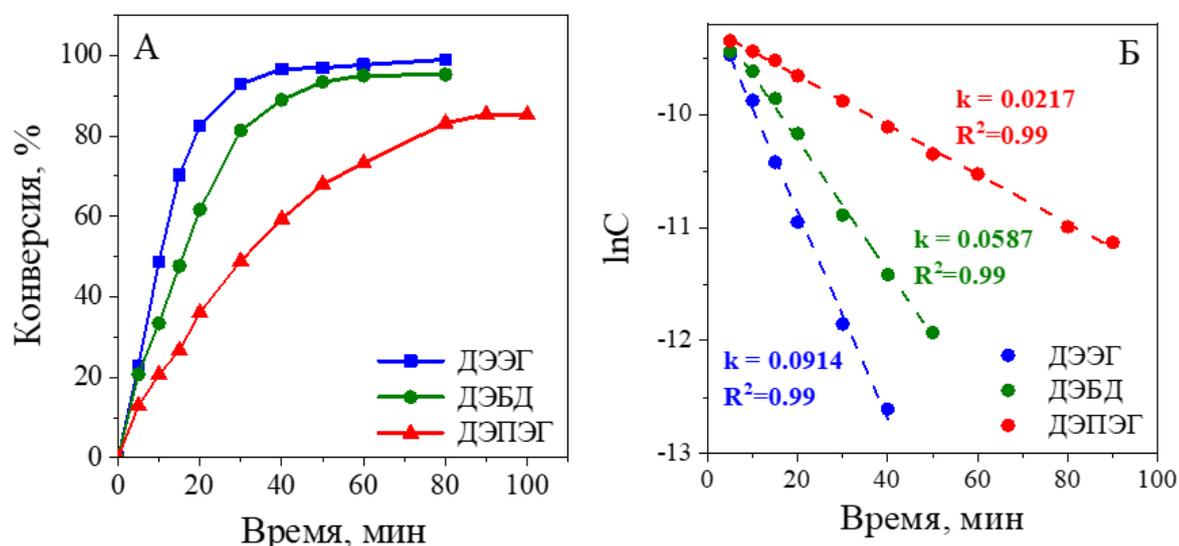


Рисунок 31 – Кинетика конверсии пара-нитрофенола в реакции с боргидридом натрия на катализаторах ДЭ:ХТЗ 1:4, содержащих 1.5% наночастиц Pd(0) (А) и линейная форма кинетических кривых, рассчитанная с использованием уравнения кинетики реакции псевдопервого порядка (Б)

В результате утолщения стенок и уменьшения просвета пор в ряду криогелей ДЭ:ХТЗ 1:4, сшитых ДЭ с разной длиной цепи: ДЭЭГ < ДЭБД < ДЭПЭГ (рисунок 32Б), скорость конверсии снижается более чем в 4 раза при постоянном содержании палладия (таблица 4).

Таблица 4 – Константы скорости реакции восстановления пара-нитрофенола боргидридом натрия на Pd(0)-содержащих катализаторах

Полимерный носитель*	Константа скорости, мин <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>
ДЭЭГ:ХТЗ 1:4	0.0914±0.004	0.99
ДЭБД:ХТЗ 1:4	0.0587±0.004	0.99
ДЭПЭГ:ХТЗ 1:4	0.0217±0.004	0.99

\*содержание палладия – 1.5 %

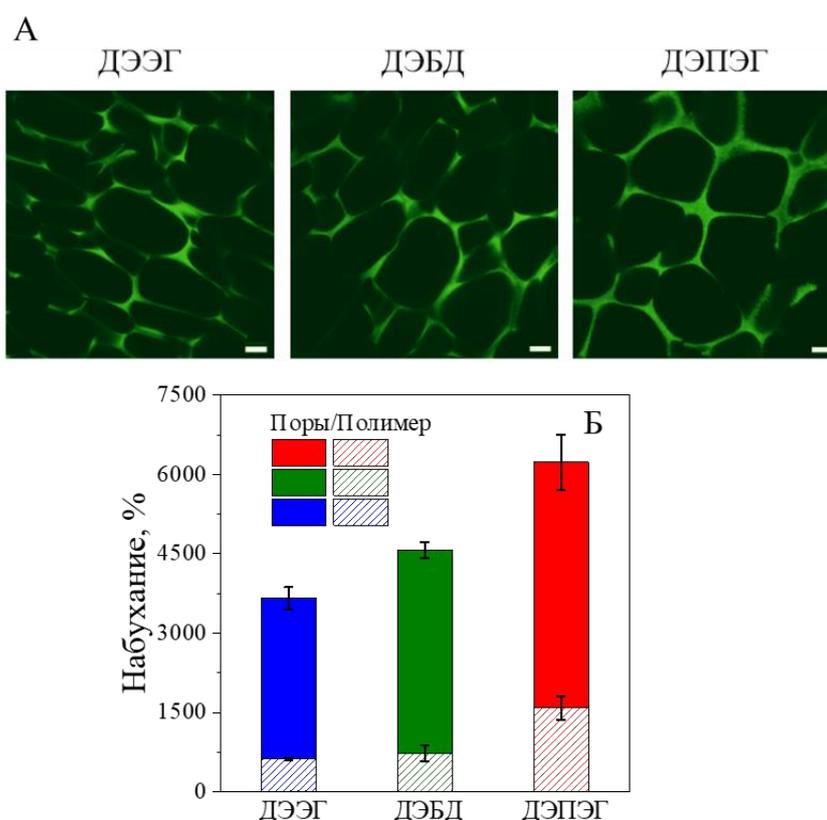


Рисунок 32 – Изображения поперечных срезов криогелей хитозана, полученные с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, мольное соотношение ДЭ:ХТЗ при шивке 1:4, масштабная линейка: 50 мкм (А); степень набухания криогелей ДЭ:ХТЗ 1:4 в воде (Б)

Таким образом, криогели, сшитые ДЭЭГ и имеющие минимальную в ряду степень набухания полимерной фазы, а также высокую проницаемость для потока жидкости, являются наиболее подходящими материалами в исследованном ряду для применения в качестве носителей палладиевых катализаторов.

## 5.3 Биомедицинское применение криогелей хитозана

### 5.3.1 Цитосовместимость криогелей хитозана и применение для 3D культивирования клеток

Динамика и сложность опухолей *in vivo* в значительной степени определяются метаболическими градиентами и механическими характеристиками микроокружения – внеклеточного матрикса (ВКМ), которые достаточно сложно имитировать *in vitro* [140,147]. Поскольку ограниченность межклеточных взаимодействий в традиционно используемых 2D моделях монослойных культур для тестирования новых лекарственных препаратов приводит к значительному расхождению между результатами доклинических и клинических испытаний [140,147,199], 3D культивирование клеток все чаще рассматривается в качестве более достоверного инструмента для имитации физиологической функции ВКМ при изучении миграции, пролиферации и агрегации клеток, а также оценке их чувствительности к лекарственным препаратам [140].

Для исследования цитотоксичности полученных криогелей хитозана и их применимости в качестве скаффолдов для 3D культивирования клеток была выбрана постоянная линия клеток карциномы прямой кишки человека (НСТ 116) и криогели, значительно отличающиеся по своим морфологическим и механическим характеристикам – ДЭБД:ХТЗ 1:4 и ДЭПЭГ:ХТЗ 1:12 [154].

Через 24 ч культивирования клеток НСТ 116 со сшивающими реагентами ДЭБД и ДЭПЭГ в концентрациях, соответствующих условиям получения криогелей, наблюдали гибель 89 и 55 % клеток соответственно (рисунок 33А), что свидетельствует о достаточно высокой цитотоксичности ДЭ. Вместе с тем в процессе сшивки хитозана эпокси группы, ответственные за токсичность ДЭ, раскрываются и участвуют в образовании новой эфирной связи, устойчивой к гидролизу. По данным ИК-спектроскопии (рисунок 18), непрореагировавшие

эпоксигруппы в криогелях не обнаруживаются, что коррелирует с высокой цитосовместимостью обоих материалов (рисунок 33Б).

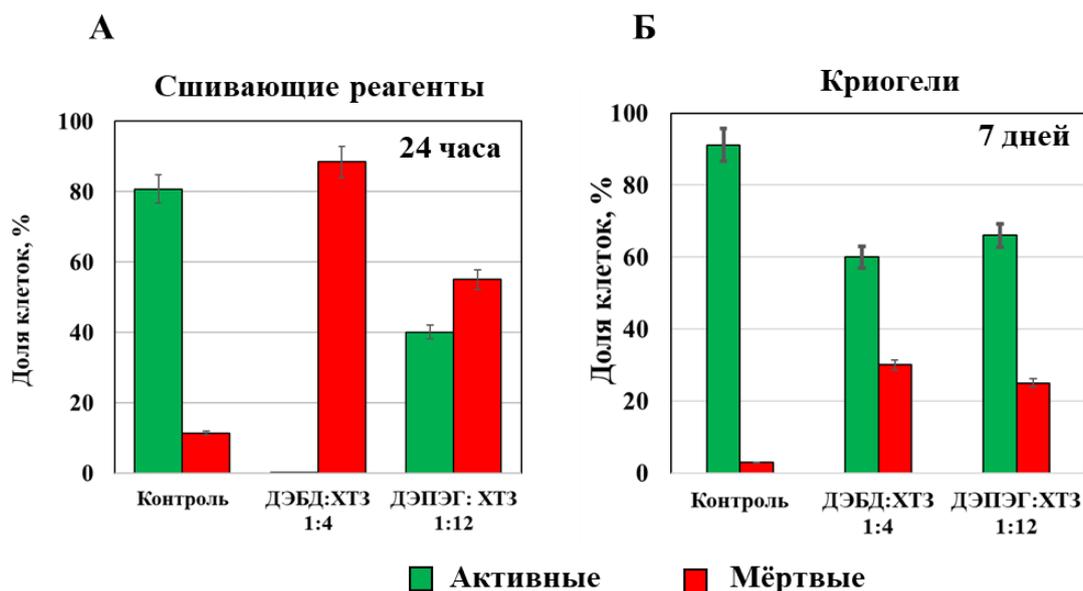


Рисунок 33 – Результаты оценки жизнеспособности и функциональной активности клеток карциномы прямой кишки человека (НСТ 116) в присутствии сшивающих реагентов ДЭБД и ДЭПЭГ через 24 ч культивирования (А) и криогелей ДЭБД:ХТЗ 1:4 и ДЭПЭГ:ХТЗ 1:12, полученных при тех же концентрациях ДЭ через 7 дней культивирования (Б)

Из рисунка 34 видно, что в более мягких криогелях ДЭПЭГ:ХТЗ 1:12 уже на третьи сутки культивирования формируются компактные клеточные сфероиды с плотными межклеточными контактами. Размер сфероидов постепенно увеличивается и к 14-ым суткам превышает 100 мкм. Несмотря на то, что доля мертвых клеток увеличивалась с увеличением времени культивирования, рост плотности клеток свидетельствует о сохранении их высокой пролиферативной активности. Снижение жизнеспособности, вероятно, наблюдается вследствие перенаселения криогеля и ограничения доступа питательных веществ к клеткам. В более жестком криогеле ДЭБД:ХТЗ 1:4 морфология клеточных агрегатов отличается в сторону преобладания контактов клеток с полимерной матрицей, в результате чего агрегаты представляют собой рыхлые структуры, в большей степени расплывающиеся по стенкам пор [200]. Жизнеспособность клеток в

криогеле ДЭБД:ХТЗ 1:4 также снижалась с увеличением времени культивирования на фоне экспоненциально растущей плотности клеток. Таким образом, можно сделать вывод, что полученные криогели хитозана цитосовместимы, пригодны для длительного 3D культивирования клеток, а морфология формирующихся клеточных агрегатов зависит от характеристик криогелей.

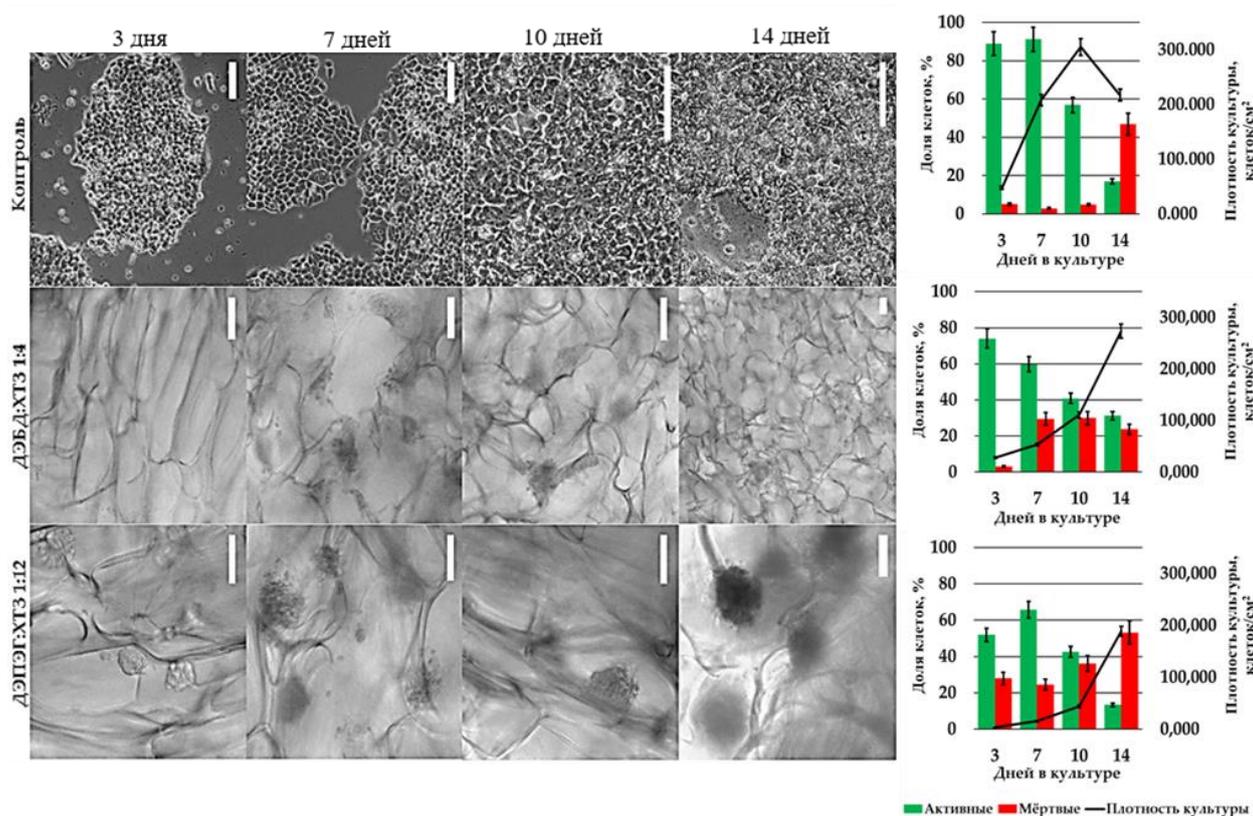


Рисунок 34 – Общий вид клеточных структур НСТ 116 и функциональная активность и плотность клеток НСТ 116 через 3, 7, 10, 14 дней культивирования в 2D (адгезионный планшет) и 3D (криогели ДЭБД:ХТЗ 1:4 и ДЭПЭГ:ХТЗ 1:12) условиях, масштабная линейка: 100 мкм

### 5.3.2 Биосовместимость криогелей хитозана

Биосовместимость криогеля ДЭЭГ:ХТЗ 1:4 исследовали *in vivo* на животной модели (мышь). После вскрытия кожного покрова над бедренной мышцей через 14 дней после операции признаков патологических изменений (кровенаполнение, отек, гиперемия кожных сосудов и мышечной ткани, наличие экссудативного

воспаления) не было выявлено ни в присутствии имплантата (левая мышца), ни в контрольной ткани (правая мышца).

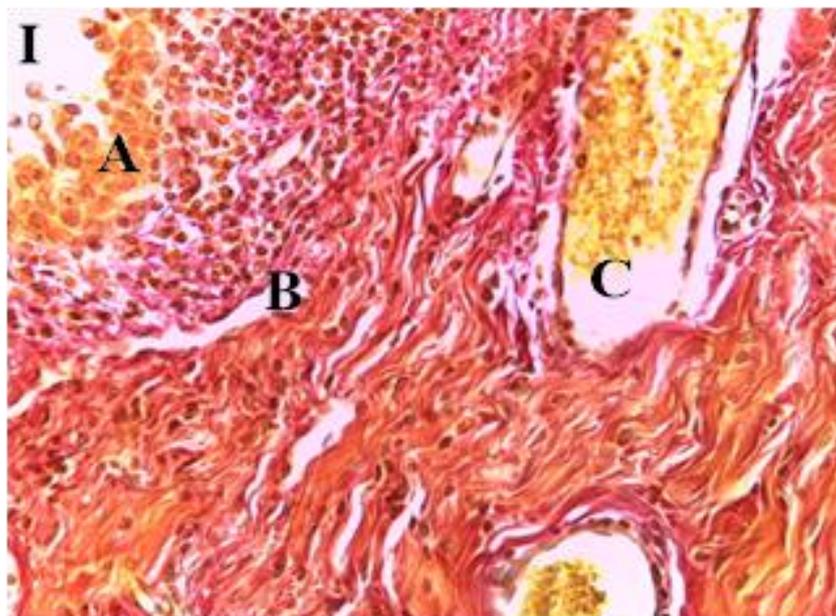


Рисунок 35 – Микрофотография гистологического препарата границы между живой тканью и имплантатом: I – имплантат; А – участок лейкоцитарной реакции; В – участок молодой соединительной ткани с коллагенизацией; С – кровеносный сосуд ( $\times 400$ )

Исследования гистологических препаратов не выявили достоверных различий в морфологии тканей и репаративных процессах в окружающих и прилежащих к имплантату тканях по сравнению с контролем. У всех экспериментальных животных умеренная воспалительная реакция вокруг имплантатов сопровождалась формированием нормальной грануляционной ткани (рисунок 35). Вокруг имплантата (рисунок 35, область I) наблюдалась умеренная лейкоцитарная реакция (рисунок 35, область А) и образование фуксинофильных коллагеновых волокон соединительной ткани активированными тканевыми фибробластами (рисунок 35, область В). Признаков выраженного роста фиброзной ткани вокруг имплантатов, а также патологических изменений в окружающих поперечнополосатых скелетных мышцах, таких как экссудативное воспаление, некроз или дистрофия

миоцитов, которые могли бы быть вызваны низкомолекулярными продуктами деградации и реактогенностью материала имплантата, также не наблюдалось.

Дистрофические и аутоиммунные изменения не выявлялись ни в функциональных тканях, прилегающих к имплантату, ни в органах (печень, почки, селезенка), ответственных за метаболизм и выведение продуктов биodeградации полимеров [201].

## ВЫВОДЫ

1. Впервые изучены особенности гелеобразования в солянокислых и уксуснокислых растворах хитозана в присутствии диглицидиловых эфиров (ДЭ). Установлено, что время гелеобразования резко снижается при  $\text{pH} > 4.5$ , а причиной низкой эффективности сшивки хитозана в уксуснокислых растворах является расход ДЭ на побочную реакцию образования сложного эфира уксусной кислоты. Впервые доказана возможность использования диглицидиловых эфиров этиленгликоля (ДЭЭГ), 1,4-бутандиола (ДЭБД) и (поли)этиленгликоля (ДЭПЭГ) для сшивки хитозана в частично замороженных растворах с получением криогелей с настраиваемой пористой структурой и свойствами. Проницаемые криогели с размером пор от  $154 \pm 37$  до  $233 \pm 57$  мкм были получены при температуре  $-10$  °С и времени сшивки 12 суток из 3 %-ных солянокислых растворов хитозана при  $\text{pH} 5.5$  в диапазоне мольных соотношений ДЭ:ХТЗ 1:4–1:20.
2. Установлено, что общая степень набухания, проницаемость и эластичность криогелей хитозана, сшитых ДЭ, растут с понижением степени сшивки. При этом с ростом длины цепи ДЭ степень набухания и эластичность увеличиваются, а проницаемость падает. Удельная потенциальная энергия деформации, нагрузка при деформации и величина гистерезиса в цикле одноосного сжатия снижаются с увеличением длины цепи ДЭ и уменьшением степени сшивки криогелей. Наиболее чувствительным к условиям сшивки параметром является устойчивость криогелей к ферментативной деградации. Для криогелей, сшитых ДЭПЭГ, скорость ферментативной деградации под действием  $\beta$ -глюканазы снижается в 612 раз при изменении мольного соотношения ДЭПЭГ:ХТЗ от 1:20 до 1:1.
3. Показано, что оптимальное соотношение проницаемости, механических и сорбционных свойств для применения криогелей в монолитных сорбционных колонках достигается при сшивке хитозана ДЭЭГ при мольном

отношении ДЭ: хитозан 1:4. Полная статическая сорбционная емкость такого криогеля по отношению к красителю ализариновому красному составила 803 мг/г, эффективная динамическая сорбционная емкость – 280 мг/г.

4. Показано, что скорость реакции каталитического восстановления нитрофенола на криогелях хитозана с нанесенными наночастицами палладия снижается в ряду сшивающих реагентов ДЭЭГ > ДЭБД > ДЭПЭГ, что коррелирует с увеличением степени набухания полимерной фазы и снижением проницаемости криогелей.
5. Впервые установлено, что криогели хитозана, сшитые ДЭ, характеризуются высокой цитосовместимостью и пригодны для длительного 3D культивирования клеток человека. При этом морфология формирующихся клеточных агрегатов зависит от характеристик криогелей. Высокая биосовместимость криогеля хитозана, сшитого ДЭЭГ, доказана в эксперименте *in vivo* на животной модели (мышь).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

C/N	атомное соотношение углерод/азот
4-НФ	4-нитрофенол
G'	модуль накопления
G''	модуль потерь
K <sub>L</sub>	константа Ленгмюра, л/ммоль
R	эффективность извлечения
ААм	акриламид
АК	ализариновый красный S
БААм	N,N'-метиленабисакриламид
ВКМ	внеклеточный матрикс
ГА	глутаровый альдегид
DMEM	питательная среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
ДСЕ	динамическая сорбционная емкость
ДЭ	диглицидиловый эфир
ДЭБА	диглицидиловой эфир бисфенол А
ДЭБД	диглицидиловый эфир 1,4 бутандиола
ДЭПЭГ	диглицидиловый эфир полиэтиленглюколя
ДЭЭГ	диглицидиловый эфир этиленглюколя
к.о./ч	колоночных объемов в час
КМХ	карбоксиметилхитозан
НПВО	приставка нарушенного полного внутреннего отражения
ПАА	полиакриламид
ПМ	потеря массы
ПММА	полиметилметакрилат
СД	степень дезацетилирования
СМ	степень модификации
СР	сшивающий реагент
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
Т:Ж	соотношение сорбент (Т) : раствор (Ж)
ХТЗ	хитозан
Э	эффективность элюирования
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Sen T., Ozcelik B., Qiao G.G., Ozmen M.M. Hierarchical porous hybrid chitosan scaffolds with tailorable mechanical properties // *Mater. Lett.* 2017. Vol. 209. No 12. P. 528–531.
2. Kil'deeva, N. R., Veleshko, I. E., Vladimirov, L. V., Nikonorov, V. V., Lozinskii, V. I., Ivanov, R. V., Mikhailov, S. N. Modification of chitosan cryogels by pyrodoxal phosphate to improve sorption capacity // *Fibre Chem.* 2012. Vol. 43. No 6. P. 29–34.
3. Savina I.N., Zoughaib M., Yergeshov A.A. Design and assessment of biodegradable macroporous cryogels as advanced tissue engineering and drug carrying materials // *Gels.* 2021. Vol. 7. No 3. P. 79.
4. Balasubramani K.P., Iroh J.O. Mechanism and kinetics of curing of diglycidyl ether of bisphenol A (DGEBA) resin by chitosan // *Polym. Eng. Sci.* 2016. Vol. 57. No 8. P. 865–874.
5. Kiuchi H., Kai W., Inoue Y. Preparation and characterization of poly (ethylene glycol) crosslinked chitosan films // *J. Appl. Polym. Sci.* 2008. Vol. 107. No 6. P. 2823–3830.
6. Liu R., Xu X., Zhuang X. Cheng B. Solution blowing of chitosan/PVA hydrogel nanofiber mats // *Carbohydr. Polym.* 2014. Vol. 101. P. 1116–1121.
7. Vijayan A., A. S., Kumar G.S.V. PEG grafted chitosan scaffold for dual growth factor delivery for enhanced wound healing // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. No 1. P. 19165.
8. Auriemma G., Russo P., Del Gaudio P., García-González C. A., Landín M., Aquino R. P. Technologies and formulation design of polysaccharide-based hydrogels for drug delivery // *Molecules.* 2020. Vol. 25. No 14. P. 3156.
9. Patel D. K., Jung E., Priya S., Won S. Y., Han S. S. Recent advances in biopolymer-based hydrogels and their potential biomedical applications // *Carbohydr. Polym.* 2024. Vol. 323. P. 121408.

10. Fan P., Zeng Y., Zaldivar-Silva D., Agüero, L., Wang, S. Chitosan-based hemostatic hydrogels: the concept, mechanism, application and prospects // *Molecules*. 2023. Vol. 28. No 3. P. 1473.
11. Lv S., Zhang S., Zuo J., Liang S., Yang J., Wang J., Wei D. Progress in preparation and properties of chitosan-based hydrogels // *Int. J. Biol. Macromol.* 2023. Vol. 242. P. 124915.
12. Xu X., He C., Luo F., Wang, H. Peng, Z. Transparent, conductive hydrogels with high mechanical strength and toughness // *Polymers*. 2021. Vol. 13. No 12. P. 1–11.
13. Zhao C., Liu G., Tan Q., Gao, M., Chen G., Huang X., Xu D. Polysaccharide-based biopolymer hydrogels for heavy metal detection and adsorption // *J. Adv. Res.* 2023. Vol. 44. No 2. P. 53–70.
14. Dinu I.A., Ghimici L., Raschip I.E. Macroporous 3D Chitosan cryogels for Fastac 10EC pesticide adsorption and antibacterial applications // *Polymers*. 2022. Vol. 14. No 15. P. 3145.
15. Souza J. F., Gularte M. S., Quadrado R. F. N., Biajoli A. F. P., Fajardo A. R. Copper species supported in polysaccharide-based materials: from preparation to application in catalysis // *Catal. Rev.* 2023. Vol. 65. No 1. P. 52–117.
16. Ng V. W. L., Chan J. M. W., Sardon H., Ono R. J., García J. M., Yang Y. Y., Hedrick J. L. Antimicrobial hydrogels: A new weapon in the arsenal against multidrug-resistant infections // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014. Vol. 78. No 11. P. 46–52.
17. Ng V. W. L., Chan J. M. W., Sardon H., Ono, R. J., García J. M., Yang Y. Y., Hedrick J. L. Hydrogels based on cellulose and chitin: Fabrication, properties, and applications // *Green Chem. Royal Society of Chemistry*, 2015. Vol. 18. No 1. P. 53–75.
18. Yang W.Y., Thirumavalavan M., Lee J.F. Effects of porogen and cross-linking agents on improved properties of silica-Supported macroporous chitosan membranes for enzyme immobilization // *J. Membr. Biol.* 2015. Vol. 248. No 2. P. 231–240.

19. Bhattarai N., Gunn J., Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010. Vol. 62. No 1. P. 83–99.
20. Andrabi S. M., Tiwari J., Singh, S., Sarkar J., Verma N., Kumar A. Supermacroporous hybrid polymeric cryogels for efficient removal of metallic contaminants and microbes from water // *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 2016. Vol. 65. No 12. P. 636–645.
21. Hedström M., Plieva F., Galaev I. Y., Mattiasson B. Monolithic macroporous albumin/chitosan cryogel structure: A new matrix for enzyme immobilization // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. Vol. 390. No 3. P. 907–912.
22. Sun S., Tang Y., Fu, Q., Liu X., Du, W., Guo L., Zhao Y. Preparation of agarose/chitosan composite supermacroporous monolithic cryogels for affinity purification of glycoproteins // *J. Sep. Sci.* 2012. Vol. 35. No 7. P. 893–900.
23. Memic A., Colombani T., Eggermont L. J., Rezaeeyazdi M., Steingold J., Rogers Z. J., Bencherif S. A. Latest advances in cryogel technology for biomedical applications // *Adv. Ther.* 2019. Vol. 2. No 4. P. 1800114.
24. Okay O. Cryogelation reactions and cryogels: principles and challenges // *Turkish J. Chem.* 2023. Vol. 47. No 5. P. 910–926.
25. O'Brien F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering // *Mater. Today.* 2011. Vol. 14. No 3. P. 88–95.
26. Chang P. H., Sekine K., Chao H. M., Hsu S. H. Chern, E. Chitosan promotes cancer progression and stem cell properties in association with Wnt signaling in colon and hepatocellular carcinoma cells // *Sci. Rep. Nature Publishing Group.* 2017. Vol. 8. No 45751 P. 1–14.
27. Pragya A., Mutalik S., Younas M. W., Pang S. K., So P. K., Wang, F., Noor N. Dynamic cross-linking of an alginate-acrylamide tough hydrogel system: time-resolved in situ mapping of gel self-assembly // *RSC Adv. Royal Society of Chemistry.* 2021. Vol. 11. No 18. P. 10710–10726.

28. Yan M., An X., Duan S., Jiang Z., Liu X., Zhao X., Li Y. A comparative study on cross-linking of fibrillar gel prepared by tilapia collagen and hyaluronic acid with EDC/NHS and genipin // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. Vol. 213. No 3. P. 639–650.
29. Moghadam M.N., Pioletti D.P. Improving hydrogels' toughness by increasing the dissipative properties of their network // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2015. Vol. 41. No 1. P. 161–167.
30. Drozdov A.D., deClaville Christiansen J. Tuning the viscoelastic response of hydrogel scaffolds with covalent and dynamic bonds // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2022. Vol. 130. No 6. P. 105179.
31. Stojkov G., Niyazov Z., Picchioni F., Bose R. K. Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications // *Gels.* 2021. Vol. 7. No 4. P. 255.
32. Hong F., Qiu, P., Wang Y., Ren P., Liu J., Zhao, J., Gou D Chitosan-based hydrogels: From preparation to applications, a review // *Food Chem. X.* 2024. Vol. 21. No 8326. P. 101095.
33. Jing H., Huang X., Du, X., Mo L., Ma C., Wang, H. Facile synthesis of pH-responsive sodium alginate/carboxymethyl chitosan hydrogel beads promoted by hydrogen bond // *Carbohydr. Polym.* 2022. Vol. 278. No 9. P. 118993.
34. Enache A. C., Cojocaru C., Samoila, P., Bele A., Bostanaru A. C., Mares, M., Harabagiu V. Evaluation of physically and/or chemically modified chitosan hydrogels for proficient release of insoluble nystatin in simulated fluids // *Gels.* 2022. Vol. 8. No 8. P.495.
35. Józwiak T., Filipkowska U., Szymczyk P., Rodziewicz J., Mielcarek, A. Effect of ionic and covalent crosslinking agents on properties of chitosan beads and sorption effectiveness of Reactive Black 5 dye // *React. Funct. Polym.* 2017. Vol. 114. P. 58–74.

36. Saleh A., Akkuş-Dağdeviren Z. B., Friedl J. D., Knoll, P., Bernkop-Schnürch A. Chitosan – Polyphosphate nanoparticles for a targeted drug release at the absorption membrane // *Heliyon*. 2022. Vol. 8. No 9. P. e10577.
37. Wu H., Lei Y., Lu J., Zhu R., Xiao D., Jiao C., Li M. Effect of citric acid induced crosslinking on the structure and properties of potato starch/chitosan composite films // *Food Hydrocoll.* 2019. Vol. 97. No 3. P. 105208.
38. Guibal E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review // *Sep. Purif. Technol.* 2004. Vol. 38. No 1. P. 43–74.
39. Xu F., Weng B., Gilkerson R., Materon L. A., Lozano, K. Development of tannic acid/chitosan/pullulan composite nanofibers from aqueous solution for potential applications as wound dressing // *Carbohydr. Polym.* 2015. Vol. 115. P. 16–24.
40. Mitra T., Sailakshmi G., Gnanamani A., Mandal A. B. Studies on cross-linking of succinic acid with chitosan/collagen // *Mater. Res.* 2013. Vol. 16. No 4. P. 755–765.
41. Sun S., Wang A. Adsorption properties and mechanism of cross-linked carboxymethyl-chitosan resin with Zn(II) as template ion // *React. Funct. Polym.* 2006. Vol. 66. No 8. P. 819–826.
42. Sun S., Wang A. Adsorption properties of N-succinyl-chitosan and cross-linked N-succinyl-chitosan resin with Pb(II) as template ions // *Sep. Purif. Technol.* 2006. Vol. 51. No 3. P. 409–415.
43. Yan H., Dai, J., Yang Z., Yang H., Cheng, R. Enhanced and selective adsorption of copper(II) ions on surface carboxymethylated chitosan hydrogel beads // *Chem. Eng. J.* 2011. Vol. 174. P. 586–594.
44. Ji C., Annabi N., Khademhosseini A., Dehghani F. Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas CO<sub>2</sub> // *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.*, 2011. Vol. 7. No 4. P. 1653–1664.
45. Dimida S., Demitri Ch., De Benedictis V., Scalera F., Gervaso F., Sannino A. Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-

related characteristics // *Journal of Applied Polymer Science*. 2015. Vol. 132. No 28. P.42256.

46. Carmona P., Tasici A. M., Sande S. A., Knudsen K. D., Nyström B. Glyceraldehyde as an efficient chemical crosslinker agent for the formation of chitosan hydrogels // *Gels*. 2021. Vol. 7. No 4. P. 186.

47. Roberts G.A.F., Taylor K.E. Chitosan gels, 3. The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde // *Macromol. Chem*. 1989. Vol. 190. P. 951–960.

48. Martínez-Mejía G., Vázquez-Torres N. A., Castell-Rodríguez A., del Río J. M., Corea M., Jiménez-Juárez R. Synthesis of new chitosan-glutaraldehyde scaffolds for tissue engineering using Schiff reactions // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp*. 2019. Vol. 579. No 3. P. 123658.

49. Pinto R. V., Gomes P. S., Fernandes M. H., Costa M. E. V., Almeida, M. M. Glutaraldehyde-crosslinking chitosan scaffolds reinforced with calcium phosphate spray-dried granules for bone tissue applications // *Mater. Sci. Eng. C*. 2020. Vol. 109. P. 110557.

50. Bhat S., Tripathi A., Kumar A. Supermacroproous chitosan–agarose–gelatin cryogels: in vitro characterization and in vivo assessment for cartilage tissue engineering // *J. R. Soc. Interface*. 2011. Vol. 8. No 57. P. 540–554.

51. Bhat S., Kumar A. Cell proliferation on three-dimensional chitosan–agarose–gelatin cryogel scaffolds for tissue engineering applications // *J. Biosci. Bioeng*. 2012. Vol. 114. No 6. P. 663–670.

52. Henderson T. M. A., Ladewig K., Haylock D. N., McLean K. M., O'Connor A. J. Cryogels for biomedical applications // *J. Mater. Chem. B*. 2013. Vol. 1. No 21. P. 2682–2695.

53. Trimukhe K.D., Varma A.J. Complexation of heavy metals by crosslinked chitin and its deacetylated derivatives // *Carbohydr. Polym*. 2008. Vol. 71. P. 66–73.

54. Sasaki T., Mizuuchi H., Sakurai K. Chitosan derivatives/calcium carbonate composite capsules prepared by the layer-by-layer deposition method II stabilization of the shell by crosslinking // *J. Nanomater.* 2011. Vol. 2011. P. 1–7.
55. Bandgar B.P., Pandit S.S. Synthesis of acyl azides from carboxylic acids using cyanuric chloride // *Tetrahedron Lett.* 2002. Vol. 43. No 18. P. 3413–3414.
56. Wang M., Xu, L., Peng J., Zhai M., Li, J., Wei, G. Adsorption and desorption of Sr(II) ions in the gels based on polysaccharide derivatives // *J. Hazard. Mater.* 2009. Vol. 171. No 1–3. P. 820–826.
57. Sahin M., Kocak N., Arslan G., Ucan, H. I. Synthesis of crosslinked chitosan with epichlorohydrin possessing two novel polymeric ligands and its use in metal removal // *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 2011. Vol. 21. No 1. P. 69–80.
58. Lam J., Kim K., Lu S., Tabata Y., Scott D. W., Mikos A. G., Kurtis Kasper, F. A factorial analysis of the combined effects of hydrogel fabrication parameters on the in vitro swelling and degradation of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 2014. Vol. 102. No 10. P. 3477–3487.
59. Bhattarai N., Matsen F.A., Zhang M. PEG-grafted chitosan as an injectable thermoreversible hydrogel // *Macromol. Biosci.* 2005. Vol. 5. No 2. P. 107–111.
60. De Bouille K. et al. A Review of the metabolism of 1,4-Butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers // *Dermatologic Surg.* 2013. Vol. 39. No 12. P. 1758–1766.
61. Lei Y., Deng L., Tang, Y., Ning Q., Lan, X., Wang Y. Hybrid Pericardium with VEGF-Loaded Hyaluronic acid hydrogel coating to improve the biological properties of bioprosthetic heart valves // *Macromol. Biosci.* 2019. Vol. 19. No 6. P. 1–9.
62. Hendriks M., Everaerts F., Verhoeven M. Bioprostheses and its alternative fixation // *J. Long. Term. Eff. Med. Implants.* 2017. Vol. 27. No 2–4. P. 137–157.
63. Shechter L., Wynstra J. Glycidyl Ether Reactions with alcohols, phenols, carboxylic acids and acid anhydrides // *Ind. Eng. Chem.* American Chemical Society, 1956. Vol. 48. No 1. P. 86–93.

64. Jayachandran B., Parvin T. N., Alam M. M., Chanda, K., MM B. Insights on chemical crosslinking strategies for proteins // *Molecules*. 2022. Vol. 27. No 23. P. 8124.
65. Zerbinati N., Lotti T., Monticelli D., Martina V., Cipolla G., D'Este, E., França, K In vitro evaluation of the sensitivity of a hyaluronic acid PEG cross-linked to bovine testes hyaluronidase // *Open Access Maced. J. Med. Sci*. 2018. Vol. 6. No 1. P. 20–24.
66. Wende F. J., Gohil S., Nord L. I., Karlsson A., Kenne, A. H., Sandström C. Insights on the reactivity of chondroitin and hyaluronan toward 1,4-butanediol diglycidyl ether // *Int. J. Biol. Macromol*. 2019. Vol. 131. P. 812–820.
67. Xue Y., Chen H., Xu C., Yu D., Xu H., Hu, Y. Synthesis of hyaluronic acid hydrogels by crosslinking the mixture of high-molecular-weight hyaluronic acid and low-molecular-weight hyaluronic acid with 1,4-butanediol diglycidyl ether // *Adv. Royal Society of Chemistry*, 2020. Vol. 10. No 12. P. 7206–7213.
68. Gámiz González M. A., Edlund U., Vidaurre, A., Gómez Ribelles J. L. Synthesis of highly swellable hydrogels of water-soluble carboxymethyl chitosan and poly(ethylene glycol) // *Polym. Int*. 2017. Vol. 66. No 11. P. 1624–1632.
69. Tripodo G., Trapani A., Rosato A., Di Franco C., Tamma R., Trapani G., Mandracchia, D. Hydrogels for biomedical applications from glycol chitosan and PEG diglycidyl ether exhibit pro-angiogenic and antibacterial activity // *Carbohydr. Polym*. 2018. Vol. 198. P. 124–130.
70. Subramanian A., Lin H.Y. Crosslinked chitosan: Its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 2005. Vol. 75. No 3. P. 742–753.
71. Gun'ko V.M., Savina I.N., Mikhalovsky S. V. Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation // *Adv. Colloid Interface Sci*. 2013. Vol. 187–188. P. 1–46.

72. Dragan E.S., Dinu M.V. Advances in porous chitosan-based composite hydrogels: Synthesis and applications // *React. Funct. Polym.* 2020. Vol. 146. No 10. P. 104372.
73. Huang R., Tan L., Cai B., Zhong T., Chen P., Fu J., Liu Y. Preparation, characterization and in vitro release study of drug-loaded sodium carboxymethylcellulose / chitosan composite sponge // *PLoS One*. 2018. Vol. 13. No 10. P. 1–15.
74. Takeshita S., Zhao S., Malfait W. J., Koebel M. M. Chemistry of chitosan aerogels: three-dimensional pore control for tailored applications // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2021. Vol. 60. No 18. P. 9828–9851.
75. Sazhnev N. A., Drozdova M. G., Rodionov I. A., Kil'deeva N. R., Balabanova T. V., Markvicheva E. A., Lozinsky V. I. Preparation of chitosan cryostructurates with controlled porous morphology and their use as 3D-scaffolds for the cultivation of animal cells // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. Vol. 54. No 5. P. 459–467.
76. Seol Y. J., Lee J. Y., Park Y. J., Lee Y. M., Ku Y., Rhyu, I. C., Chung C. P. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation // *Biotechnol. Lett.* 2004. Vol. 26. No 13. P. 1037–1041.
77. Dragan E.S., Perju M.M., Dinu M.V. Preparation and characterization of IPN composite hydrogels based on polyacrylamide and chitosan and their interaction with ionic dyes // *Carbohydr. Polym.* 2012. Vol. 88. No 1. P. 270–281.
78. Hu S., Bi, S., Yan D., Zhou Z., Sun G., Cheng, X., Chen X. Preparation of composite hydroxybutyl chitosan sponge and its role in promoting wound healing // *Carbohydr. Polym.* 2018. Vol. 184. P. 154–163.
79. Annabi N., Nichol J. W., Zhong X., Ji, C., Koshy S., Khademhosseini, A., Dehghani F. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering // *Tissue Eng. - Part B Rev.* 2010. Vol. 16. No 4. P. 371–383.

80. Bajaj P., Schweller R. M., Khademhosseini A., West, J. L., Bashir R. 3D Biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2014. Vol. 16. No 1. P. 247–276.
81. Patent US 5840777. Method of Producing Polysaccharide Foams / Eagels D. B., Bakis G., Jeffery A. B., Mermingis C., Hagoort T. H. 1998. No 19.
82. Патент РФ 2356581 Способ получения пористых губок на основе хитозана для заполнения костных дефектов / Смирнов В.В., Федотов А.Ю., Баринов С.М., Фадеева И. В., Тютюкова Ю.Б. № 2007148150/15; заявл. 26.12.2007; опубл. 27.05.2009, бюл. №15.
83. Kaynak Bayrak G., Demirtaş T.T., Gümüşderelioğlu M. Microwave-induced biomimetic approach for hydroxyapatite coatings of chitosan scaffolds // *Carbohydr. Polym.* 2017. Vol. 157. P. 803–813.
84. Prasad A., Sankar M. R., Katiyar V. State of Art on Solvent casting particulate leaching method for orthopedic scaffolds fabrication // *Mater. Today Proc.* 2017. Vol. 4. No 2. P. 898–907.
85. Lim J. I., Lee Y. K., Shin J. S., Lim K.J. Preparation of interconnected porous chitosan scaffolds by sodium acetate particulate leaching // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2011. Vol. 22. No 10. P. 1319–13129.
86. Bharadwaz A., Jayasuriya A.C. Fabrication of porous chitosan particles using a novel two-step porogen leaching and lyophilization method with the label-free multivariate spectral assessment of live adhered cells // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2021. Vol. 208. P. 112094.
87. De Rosa C., Auriemma F., Di Girolamo R. Kinetic analysis of cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol)/water solutions by small-angle neutron scattering // *Polymeric cryogels. Advances in Polymer Science* 263. 2014. P. 159–197.
88. Plieva F. M., Karlsson M., Aguilar M. R., Gomez D., Mikhalovsky S., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. Pore structure of macroporous monolithic cryogels prepared from poly(vinyl alcohol) // *J. Appl. Polym. Sci.* 2006. Vol. 100. No 2. P. 1057–1066.

89. Лозинский В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения // Успехи химии 71 (6). 2002. P. 559–585.
90. Okay O., Lozinsky V.I. Synthesis and structure–property relationships of cryogels // Polymeric cryogels. Advances in polymer science. 2014. P. 103–158.
91. Lozinsky V.I., Okay O. Basic Principles of Cryotropic Gelation // Polymeric cryogels. Advances in polymer science. 2014. P. 49–103.
92. Wartenberg A., Weisser J., Schnabelrauch M. Glycosaminoglycan-based cryogels as scaffolds for cell cultivation and tissue regeneration // Molecules. 2021. Vol. 26. No 18. P. 5597.
93. Bakhshpour M., Idil N., Perçin I., Denizli A. Biomedical applications of polymeric cryogels // Appl. Sci. 2019. Vol. 9. No 3. P. 1–22.
94. Nikonorov V. V., Ivanov R. V., Kil'deeva N. R., Lozinskii V. I. Effect of polymer-precursor molecular mass on the formation and properties of covalently crosslinked chitosan cryogels // Polym. Sci. - Ser. A. 2011. Vol. 53. No 12. P. 1150–1158.
95. Nikonorov V. V., Ivanov R. V., Kil'Deeva N. R., Bulatnikova L. N., Lozinskii V. I Synthesis and characteristics of cryogels of chitosan crosslinked by glutaric aldehyde // Polym. Sci. - Ser. A. 2010. Vol. 52. No 8. P. 828–834.
96. Zhang H., Liu C., Chen, L., Dai B. Control of ice crystal growth and its effect on porous structure of chitosan cryogels // Chem. Eng. Sci. 2019. Vol. 201. P. 50–57.
97. Demir D., Bölgen N. Synthesis and characterization of injectable chitosan cryogel microsphere scaffolds // Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater. 2017. Vol. 66. No 13. P. 686–696.
98. Zhang L., Zhao, J., Zhu J., He, C., Wang H. Anisotropic tough poly(vinyl alcohol) hydrogels // Soft Matter. 2012. Vol. 8. No 40. P. 10439–10447.
99. Amaral-Labat G., Szczurek A., Fierro, V., Stein N., Boulanger C., Pizzi, A., Celzard A Pore structure and electrochemical performances of tannin-based carbon cryogels // Biomass and Bioenergy. 2012. Vol. 39. P. 274–282.

100. Sen T., Ozcelik B., Ozmen M.M. Tough and hierarchical porous cryogel scaffolds preparation using n-butanol as a non-solvent // *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 2019. Vol. 68. No 7. P. 411–416.
101. Purohit S., Chini M. K., Chakraborty T., Yadav, K. L., Satapathi S Rapid removal of arsenic from water using metal oxide doped recyclable cross-linked chitosan cryogel // *SN Appl. Sci.* Springer International Publishing. 2020. Vol. 2. No 4. P. 1–10.
102. Study A. C., Humelnicu D., Dragan, E. S., Ignat M. Molecules and Cr<sup>3+</sup> metal ions removal from industrial wastewaters by chitosan-based composite cryogels // *Molecules.* 2020. Vol. 25. No 11. P. 1–18.
103. Lazar M.M., Dinu I.A., Dinu M.V. Synthesis of ethylenediaminetetraacetic acid-functionalized chitosan cryogels as potential sorbents of heavy metal ions // *Mater. Plast.* 2021. Vol. 58. No 2. P. 155–166.
104. Podorozhko E. A., Lunev I. A., Ryabev A. N., Kil'deeva N. R., Lozinsky, V. I. A study of cryostructuring of a polymer system. 39. Poly(vinyl alcohol) composite cryogels filled with chitosan microparticles // *Colloid J.* 2015. Vol. 77. No 2. P. 186–195.
105. Berillo D., Arysbeq A. Chitosan glutaraldehyde cryogels for wastewater treatment and extraction of silver nanoparticles // *Processes.* 2023. Vol. 11. No 6. P. 1661.
106. Dinu M. V., Dinu I. A., Lazar, M. M., Dragan E. S. Chitosan-based ion-imprinted cryo-composites with excellent selectivity for copper ions // *Carbohydr. Polym.* 2018. Vol. 186. No 1. P. 140–149.
107. Stela E., Humelnicu D., Valentina M. Development of chitosan-poly (ethyleneimine) based double network cryogels and their application as superadsorbents for phosphate // *Carbohydr. Polym.* 2019. Vol. 210. No 1. P. 17–25.
108. Masys A., Bichler G., Bourlai T., Johnson C., Leuprecht C., Morse E., Skillicorn D., Yamagata Yo. Water safety, security and sustainability / ed. Vaseashta A., Maftei C. Cham: Springer International Publishing. 2021. 1–731 p.

109. Sahiner N., Demirci S. PEI-based hydrogels with different morphology and sizes: Bulkgel, microgel, and cryogel for catalytic energy and environmental catalytic applications // *Eur. Polym. J.* 2016. Vol. 76. P. 156–169.
110. Pestov A., Bratskaya S. Chitosan and its derivatives as highly efficient polymer ligands // *Molecules.* 2016. Vol. 21. No 3. P. 330.
111. Yuan G., Keane M.A. Catalyst deactivation during the liquid phase hydrodechlorination of 2,4-dichlorophenol over supported Pd: Influence of the support // *Catal. Today.* 2003. Vol. 88. No 1–2. P. 27–36.
112. Nasrollahzadeh M., Shafiei N., Nezafat Z., Soheili Bidgoli, N. S., Soleimani F. Recent progresses in the application of cellulose, starch, alginate, gum, pectin, chitin and chitosan based (nano)catalysts in sustainable and selective oxidation reactions: A review // *Carbohydr. Polym.* 2020. Vol. 241. No 3. P. 116353.
113. El Kadib A., Primo A., Molvinger K., Bousmina M., Brunel D. Nanosized vanadium, tungsten and molybdenum oxide clusters grown in porous chitosan microspheres as promising hybrid materials for selective alcohol oxidation // *Chem. - A Eur. J.* 2011. Vol. 17. No 28. P. 7940–7946.
114. Dmitriy B. Gold nanoparticles incorporated into cryogel walls for efficient nitrophenol conversion // *J. Clean. Prod.* 2020. Vol. 247. P. 119089.
115. Berillo D., Cundy A. 3D-macroporous chitosan-based scaffolds with in situ formed Pd and Pt nanoparticles for nitrophenol reduction // *Carbohydr. Polym.* 2018. Vol. 192. P. 166–175.
116. Akilbekova D., Shaimerdenova M., Adilov, S., Berillo D. Biocompatible scaffolds based on natural polymers for regenerative medicine // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 114. P. 324–333.
117. Hou S., Liu Y., Feng F., Zhou J., Feng, X., Fan Y Polysaccharide-peptide cryogels for multidrug-resistant-bacteria infected wound healing and hemostasis // *Adv. Healthc. Mater.* 2020. Vol. 9. No 3. P. 1–7.

118. Dragostin O. M., Samal S. K., Dash M., Lupascu F., Pânzariu A., Tuchilus, C., Profire, L. New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications // *Carbohydr. Polym.* 2016. Vol. 141. P. 28–40.
119. Rabea E. I., Badawy M. E. T., Stevens C. V., Smaghe, G., Steurbaut, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action // *Biomacromolecules.* 2003. Vol. 4. No 6. P. 1457–1465.
120. Anisiei A., Rosca, I., Sandu A. I., Bele, A., Cheng X., Marin L Imination of microporous chitosan fibers—a route to biomaterials with “On demand” antimicrobial activity and biodegradation for wound dressings // *Pharmaceutics.* 2022. Vol. 14. No 1. P. 117.
121. Çetin K., Denizli A. 5-Fluorouracil delivery from metal-ion mediated molecularly imprinted cryogel discs // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2015. Vol. 126. P. 401–406.
122. Freier T., Koh H. S., Kazazian K., Shoichet M. S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation // *Biomaterials.* 2005. Vol. 26. No 29. P. 5872–5878.
123. Tomihata K., Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives // *Biomaterials.* 1997. Vol. 18. No 7. P. 567–575.
124. Agarwal T., Narayan. R., Maji S., Behera S., Kulanthaivel, S., Maiti, T. K., Giri S. Gelatin/Carboxymethyl chitosan based scaffolds for dermal tissue engineering applications // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. Vol. 93. P. 1499–1506.
125. Maji S., Agarwal T., Das J., Maiti T. K Development of gelatin/carboxymethyl chitosan/nano-hydroxyapatite composite 3D macroporous scaffold for bone tissue engineering applications // *Carbohydrate Polymers.* 2018. Vol. 189. P.115–125.
126. Reyna-Urrutia V. A., Mata-Haro V., Cauich-Rodriguez J. V., Herrera-Kao W. A., Cervantes-Uc J. M Effect of two crosslinking methods on the physicochemical

and biological properties of the collagen-chitosan scaffolds // *Eur. Polym. J.* 2019. Vol. 117. No 4. P. 424–433.

127. Zhao L., Wu Y., Chen, S., Xing T Preparation and characterization of cross-linked carboxymethyl chitin porous membrane scaffold for biomedical applications // *Carbohydr. Polym.* 2015. Vol. 126. P. 150–155.

128. Takei T., Nakahara H., Ijima, H., Kawakami K. Synthesis of a chitosan derivative soluble at neutral pH and gellable by freeze-thawing, and its application in wound care // *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.* 2012. Vol. 8. No 2. P. 686–693.

129. Poshina D. N., Raik S. V., Poshin, A. N., Skorik Y. A. Accessibility of chitin and chitosan in enzymatic hydrolysis: A review // *Polym. Degrad. Stab.* 2018. Vol. 156. P. 269–278.

130. Muzzarelli R.A.A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives // *Cell. Mol. Life Sci.* 1997. Vol. 53. No 2. P. 131–140.

131. Lim S. M., Song D. K., Oh, S. H., Lee-Yoon D. S., Bae E. H. Lee, J. H. In vitro and in vivo degradation behavior of acetylated chitosan porous beads // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2008. Vol. 19. No 4. P. 453–466.

132. Islam N., Dmour I., Taha M.O. Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery // *Heliyon.* 2019. Vol. 5. No 5. P. e01684.

133. Tanuma H., Saito, T., Nishikawa K., Dong, T., Yazawa, K., Inoue Y Preparation and characterization of PEG-cross-linked chitosan hydrogel films with controllable swelling and enzymatic degradation behavior // *Carbohydr. Polym.* 2010. Vol. 80. No 1. P. 260–265.

134. Leach J. B., Wolinsky J. B., Stone P. J. Wong J. Y. Crosslinked  $\alpha$ -elastin biomaterials: towards a processable elastin mimetic scaffold // *Acta Biomater.* 2005. Vol. 1. No 2. P. 155–164.

135. Kono H. Characterization and properties of carboxymethyl cellulose hydrogels crosslinked by polyethylene glycol // *Carbohydr. Polym.* 2014. Vol. 106. No 1. P. 84–93.
136. Kang Y., Datta, P., Shanmughapriya, S., Ozbolat I. T. 3D Bioprinting of tumor models for cancer research // *ACS Appl. Bio Mater.* 2020. Vol. 3. No 9. P. 5552–5573.
137. Kumar A., Bansal V., Nandakumar K. S., Galaev I. Y., Roychoudhury P. K., Holmdahl R., Mattiasson B. Integrated bioprocess for the production and isolation of urokinase from animal cell culture using supermacroporous cryogel matrices // *Biotechnol. Bioeng.* 2006. Vol. 93. No 4. P. 636–646.
138. Dainiak M. B., Savina, I. N., Musolino I., Kumar A., Mattiasson B., Galaev, I. Y. Biomimetic macroporous hydrogel scaffolds in a high-throughput screening format for cell-based assays // *Biotechnol. Prog.* 2008. Vol. 24. No 6. P. 1373–1383.
139. Chang T.T., Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes // *Tissue Eng. - Part A.* 2009. Vol. 15. No 3. P. 559–567.
140. Fang J. Y., Tan S. J., Yang, Z., Tayag C., Han B Tumor bioengineering using a transglutaminase crosslinked hydrogel // *PLoS One* / ed. Burns J.S. 2014. Vol. 9. No 8. P. e105616.
141. Reidy E., Leonard N. A., Treacy, O., Ryan A. E. A 3D view of colorectal cancer models in predicting therapeutic responses and resistance // *Cancers.* 2021. Vol. 13. No 2. P. 227.
142. Sant S., Johnston P.A. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery // *Drug Discov. Today Technol.* 2017. Vol. 23. P. 27–36.
143. Lee J., Abdeen, A. A., Wycislo K. L., Fan, T. M., Kilian, K. A. Interfacial geometry dictates cancer cell tumorigenicity // *Nat. Mater.* 2016. Vol. 15. No 8. P. 856–862.

144. Yeh Y. T., Hur S. S., Chang J., Wang, K. C., Chiu J. J., Li Y. S., Chien S. Matrix stiffness regulates endothelial cell proliferation through Septin 9 // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. No 10. P. 1–13.
145. Micek H. M., Visetsouk M. R., Masters K. S., Kreeger P. K. Engineering the extracellular matrix to model the evolving tumor microenvironment // *Science*. 2020. Vol. 23. No 11. P. 101742.
146. Berger A. J., Linsmeier K. M., Kreeger P. K., Masters K. S. Decoupling the effects of stiffness and fiber density on cellular behaviors via an interpenetrating network of gelatin-methacrylate and collagen // *Biomaterials*. 2017. Vol. 141. P. 125–135.
147. Ivanovska J., Zehnder T., Lennert P., Sarker B., Boccaccini A. R., Hartmann, A. Detsch, R. Biofabrication of 3D alginate-based hydrogel for cancer research: comparison of cell spreading, viability and adhesion characteristics of colorectal HCT116 tumor cells // *Tissue Eng. Part C Methods*. 2016. Vol. 22. No 7. P. 708–715.
148. Nikolaev M., Mitrofanova O., Broguiere N., Geraldo S., Dutta D., Tabata, Y., Lutolf M. P. Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis // *Nature*. 2020. Vol. 585. No 7826. P. 574–578.
149. Baker A. M., Bird D., Lang G., Cox, T. R., Eler J. T Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK // *Oncogene*. 2013. Vol. 32. No 14. P. 1863–1868.
150. Pepelanova I., Kruppa K., Scheper T., Lavrentieva A. Gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogels with defined degree of functionalization as a versatile toolkit for 3D cell culture and extrusion bioprinting // *Bioengineering*. 2018. Vol. 5. No 3. P. 55.
151. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat. Methods*. Nature Publishing Group. 2012. Vol. 9. No 7. P. 671–675.
152. Zvukova N. D., Klimova T. P., Ivanov R. V., Ryabev A. N., Tsiskarashvili A. V., Lozinsky V. I. Cryostructuring of polymeric systems. 52. Properties,

microstructure and an example of a potential biomedical use of the wide-pore alginate cryostructurates // *Gels*. 2019. Vol. 5. No 2. P. 25.

153. Bratskaya S., Skatova A.V., Privar Yu., Boroda A., Kantemirova E., Maiorova M., Pestov A. Stimuli-responsive dual cross-linked N-carboxyethylchitosan hydrogels with tunable dissolution rate // *Gels*. 2021. Vol. 7. No 4. P. 188.

154. Privar Yu., Boroda A., Pestov A.V., Kazantsev D., Malyshev D., Skatova A.V., Bratskaya S. Chitosan cryogels cross-linked with 1,1,3-triglycidyl oxopropane: mechanical properties and cytotoxicity for cancer cell 3D cultures // *Biomimetics*. 2023. Vol. 8. No 2. P. 1–12.

155. Maheras K.J., Gow A. Increased anesthesia time using 2,2,2-tribromoethanol–chloral hydrate with low impact on mouse psychoacoustics // *J. Neurosci. Methods*. 2013. Vol. 219. No 1. P. 61–69.

156. Disbrey B.D., Rack J.H. *Book of histological laboratory methods*. edinburgh: livingstone. 1970. 396 p.

157. Al-Sibani M., Al-Harrasi A., Neubert R.H.H. Study of the effect of mixing approach on cross-linking efficiency of hyaluronic acid-based hydrogel cross-linked with 1,4-butanediol diglycidyl ether // *Eur. J. Pharm. Sci*. 2016. Vol. 91. P. 131–137.

158. Zerbinati N., Sommatis S., Maccario C., Capillo M. C., Grimaldi G., Alonci, G., Mocchi R. Toward physicochemical and rheological characterization of different injectable hyaluronic acid dermal fillers cross-linked with polyethylene glycol diglycidyl ether // *Polymers*. 2021. Vol. 13. No 6. P. 948.

159. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений : практич. рук-во / К. Наканиси. – Москва : Изд-во Мир, 1965. – 216 с.

160. Tomaz A. F., de Carvalho S. M. S., Barbosa R. C., Silva S. M. L., Gutierrez M. A. S., de Lima A. G. B., Fook M. V. L. Ionically crosslinked chitosan membranes used as drug carriers for cancer therapy application // *Materials*. 2018. Vol. 11. No 10. P. 2051.

161. Pretsch E., Bühlmann P., Affolter C. Structure determination of organic compounds: Tables of spectral data. Fifth edition Heidelberg: Springer. 2020. P. 1–478.
162. Privar Y.; Skatova A. Golikov A.; Boroda A.; Bratskaya S. Gelation and cryogelation of chitosan: origin of low efficiency of diglycidyl ethers as cross-linkers in acetic acid solutions. *Polysaccharides*. 2024. Vol. 5. No 4. P. 731–742.
163. Shechter L., Wynstra J., Kurkcy R.P. Glycidyl ether reactions with amines // *Ind. Eng. Chem*. 1956. Vol. 48. No 1. P. 94–97.
164. Chemical properties of oxirane, 2,2'-[1,4-butanediylbis(oxymethylene)]bis [Electronic resource]. URL: <https://www.chemeo.com/cid/12-593-0/Oxirane-2-2-1-4-butanediylbis-oxymethylene-bis>.
165. Chemical properties of ethylene glycol diglycidyl ether [Electronic resource]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethylene-glycol-diglycidyl-ether>.
166. Gao C., Wang Y., Shi J., Wang Y., Huang X., Chen X., Yang Y. Superamphiphilic chitosan cryogels for continuous flow separation of oil-in-water emulsions // *ACS Omega*. 2022. Vol. 7. No 7. P. 5937–5945.
167. Kathuria N., Tripathi A., Kar K. K., Kumar A. Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering // *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.*, 2009. Vol. 5. No 1. P. 406–418.
168. Privar Y., Modin E., Bratskaya S. Removal of alizarin red by supermacroporous cross-linked chitosan monolith sorbents // *Prog. Chem. Appl. Chitin its Deriv*. 2019. Vol. XXIV. P. 164–171.
169. Privar Y. Skatova A., Maiorova M., Golikov A., Boroda, A., Bratskaya, S. Tuning mechanical properties, swelling, and enzymatic degradation of chitosan cryogels using diglycidyl ethers of glycols with different chain length as cross-linkers. *Gels*. 2024. Vol. 10. No 7. P. 483.
170. Rinaudo M., Pavlov G., Desbrières J. Solubilization of Chitosan in Strong Acid Medium // *Int. J. Polym. Anal. Charact*. 1999. Vol. 5. No 3. P. 267–276.

171. Wang W., Xu D. Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation // *Int. J. Biol. Macromol.* 1994. Vol. 16. No 3. P. 149–152.
172. Wyatt N.B., Gunther C.M., Liberatore M.W. Increasing viscosity in entangled polyelectrolyte solutions by the addition of salt // *Polymer.* 2011. Vol. 52. No 11. P. 2437–2444.
173. Cafiso D., Bernabei F., Lo Preti M., Lantean S., Roppolo I., Pirri C. F., Beccai L. DLP-Printable porous cryogels for 3D soft tactile sensing // *Adv. Mater. Technol.* 2024. Vol. 9. No 10. P. 2302041
174. Rege A. Constitutive modeling of the densification behavior in open-porous cellular solids // *Materials.* 2021. Vol. 14. No 11. P. 1–10.
175. Xu K., Ganapathy K., Andl T., Wang Z., Copland J. A., Chakrabarti R., Florczyk S. J. 3D porous chitosan-alginate scaffold stiffness promotes differential responses in prostate cancer cell lines // *Biomaterials.* 2019. Vol. 217. No 6. P. 119311.
176. Guitian Oliveira N., Sirgado T., Reis, L., Pinto L. F. V., da Silva C. L., Ferreira, F. C., Rodrigues A. In vitro assessment of three-dimensional dense chitosan-based structures to be used as bioabsorbable implants // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2014. Vol. 40. P. 413–425.
177. Tanuma H. et al. Characterization and enzymatic degradation of PEG-cross-linked chitosan hydrogel films // *J. Appl. Polym. Sci.* 2009. Vol. 114. No 3. P. 1902–1907.
178. Den Tandt W. R., Inaba T., Verhamme I., Overdyk B., Brouwer J., Prieur, D. Non-identity of human plasma lysozyme and 4-methylumbelliferyl-tetra-N-acetyl- $\beta$ -D-chitotetraoside hydrolase // *Int. J. Biochem.* 1988. Vol. 20. No 7. P. 713–719.
179. Den Tandt W. R., Scharpe S., Overdijk B. Evaluation on the hydrolysis of methylumbelliferyl-tetra-N-acetylchitotetraoside by various glucosidases. A comparative study // *Int. J. Biochem.* 1993. Vol. 25. No 1. P. 113–119.

180. Massarente V. S., de Araujo Zanoni J., Gomes E., Bonilla-Rodriguez G. O. Biochemical characterization of endoglucanases produced by *Myceliophthora thermophila* M.7.7 in solid-state culture // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2020. Vol. 27. No 2. P. 101684.
181. Bonfá E. C., de Souza Moretti M. M., Gomes E., Bonilla-Rodriguez G. O. Biochemical characterization of an isolated 50 kDa beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M.7.7 // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2018. Vol. 13. No 1. P. 311–318.
182. Xia W., Liu P., Liu J. Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases // *Bioresour. Technol.* 2008. Vol. 99. No 15. P. 6751–6762.
183. Khasanova L. M., Il'ina A. V., Varlamov V. P., Sinitsyna O. A., Sinitsyn A. P. Hydrolysis of chitosan with an enzyme complex from *Myceliophthora* sp. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2014. Vol. 50. No 4. P. 381–386.
184. Vakili M., Rafatullah M., Salamatinia B., Abdullah A. Z., Ibrahim M. H., Tan K. B., Amouzgar P. Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review // *Carbohydr. Polym.* 2014. Vol. 113. P. 115–130.
185. Wang Y., Wang H., Peng H., Wang Z., Wu J., Liu Z. Dye adsorption from aqueous solution by cellulose/chitosan composite: equilibrium, kinetics and thermodynamics // *Fibers Polym.* 2018. Vol. 19. No 2. P. 340–349.
186. Pestov A. V., Privar Y. O., Modin E. B., Ustinov A. Y., Bratskaya S. Y. Granulated catalytic materials based on chitosan and its derivatives // *Polym. Sci. - Ser. B.* 2016. Vol. 58. No 6. P. 730–735.
187. Azlan K., Wan Saime W.N., Lai Ken L. Chitosan and chemically modified chitosan beads for acid dyes sorption // *J. Environ. Sci. The Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences*, 2009. Vol. 21. No 3. P. 296–302.

188. Bellaj M., Yazid H., Aziz K., Regti A., Haddad M. E., Achaby M. E., Aziz, F. Eco-friendly synthesis of clay-chitosan composite for efficient removal of alizarin red S dye from wastewater: A comprehensive experimental and theoretical investigation // *Environ. Res.* 2024. Vol. 247. No 12. P. 118352.
189. Fan L., Zhang Y., Li, X., Luo C., Lu F., Qiu H. Removal of alizarin red from water environment using magnetic chitosan with Alizarin Red as imprinted molecules // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2011. Vol. 91. P. 250–257.
190. Ranjbari S., Tanhaei B., Ayati, A., & Sillanpää M. Novel Aliquat-336 impregnated chitosan beads for the adsorptive removal of anionic azo dyes // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 125. P. 989–998.
191. Nuengmatcha P., Mahachai R., Chanthai S. Adsorption capacity of the as-synthetic graphene oxide for the removal of alizarin red S dye from aqueous solution // *Orient. J. Chem.* 2016. Vol. 32. No 3. P. 1399–1410.
192. Vakili M., Deng S., Shen L., Shan D., Liu, D., Yu G. Regeneration of chitosan-based adsorbents for eliminating dyes from aqueous solutions // *Sep. Purif. Rev.* 2017. Vol. 48. No 1. P. 1–13.
193. Alonso A., Shafir A., MacAnás J., Vallribera A., Muñoz M., Muraviev D. N. Recyclable polymer-stabilized nanocatalysts with enhanced accessibility for reactants // *Catal. Today.* 2012. Vol. 193. No 1. P. 200–206.
194. Calore L., Cavinato G., Canton, P., Peruzzo L., Tauro L., Corain B. Metal catalysis with nanostructured metals supported on strongly acidic cross-linked polymer frameworks. Part I. the behaviour of  $M^{2+}$  ions ( $M = Ni, Pd, Pt, Cu$ ) supported on Rohm & Haas's resin A70 and du Pont's SAC-13, towards  $H_2$  in the solid state and Na // *React. Funct. Polym.* 2010. Vol. 70. No 9. P. 639–646.
195. Murugadoss A., Sakurai H. Chitosan-stabilized gold, gold–palladium, and gold–platinum nanoclusters as efficient catalysts for aerobic oxidation of alcohols // *J. Mol. Catal. A Chem.* 2011. Vol. 341. No 1–2. P. 1–6.

196. Guibal E. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review // *Prog. Polym. Sci.* 2005. Vol. 30. No 1. P. 71–109.
197. Raspolli Galletti A. M., Antonetti C., Bertoldo M., Piccinelli F. Chitosan as biosupport for the MW-assisted synthesis of palladium catalysts and their use in the hydrogenation of ethyl cinnamate // *Appl. Catal. A Gen.* 2013. Vol. 468. P. 95–101.
198. Leonhardt S. E. S., Stolle A., Ondruschka B., Cravotto G., Leo C. D., Jandt K. D., Keller T. F. Chitosan as a support for heterogeneous Pd catalysts in liquid phase catalysis // *Appl. Catal. A Gen.* 2010. Vol. 379. No 1–2. P. 30–37.
199. Dainiak M. B., Savina I. N., Musolino I., Kumar A., Mattiasson B., Galaev I. Y. Biomimetic macroporous hydrogel scaffolds in a high-throughput screening format for cell-based assays // *Biotechnol. Prog.* 2008. Vol. 24. No 6. P. 1373–1383.
200. Boroda A., Privar Y., Maiorova M., Skatova A., Bratskaya S. Sponge-like scaffolds for colorectal cancer 3D Models: substrate-driven difference in micro-tumors morphology // *Biomimetics.* 2022. Vol. 7. No 2. P. 56.
201. Bratskaya S., Privar Y., Nesterov D., Modin E., Kodess M., Slobodyuk, A., Pestov A. Chitosan gels and cryogels cross-linked with diglycidyl ethers of ethylene glycol and polyethylene glycol in acidic media // *Biomacromolecules.* 2019. Vol. 20. No 4. P. 1635–1643.

## Приложение 1: Обработка реологических кривых

Имеется набор  $n$  экспериментальных реологических кривых. Каждая кривая состоит из двух ветвей – восходящей и нисходящей. Восходящая ветвь кривой  $i$  содержит  $m_{F,i}$  точек  $P_{F,ij}, x_{F,ij}$ , нисходящая -  $m_{B,i}$  точек  $P_{B,ij}, x_{B,ij}$ . Находится общая область определения всех кривых:

$$\begin{aligned}
 x_{F,\min} &= \max_i \left( \min_j (x_{F,ij}) \right) \\
 x_{F,\max} &= \min_i \left( \max_j (x_{F,ij}) \right) \\
 x_{B,\min} &= \max_i \left( \min_j (x_{B,ij}) \right) \\
 x_{B,\max} &= \min_i \left( \max_j (x_{B,ij}) \right) \\
 x_{\min} &= \max(x_{F,\min}, x_{B,\min}) \\
 x_{\max} &= \min(x_{F,\max}, x_{B,\max})
 \end{aligned} \tag{1}$$

Восходящая и нисходящая ветвь каждой кривой описывается линейным сплайном с  $m_{F,i}$  и  $m_{B,i}$  узлами. В результате, для каждой кривой  $i$  получаем два сплайна:  $P_{F,i} = S_{F,i}(x)$ ;  $P_{B,i} = S_{B,i}(x)$ . Линейные сплайны (в отличие от кубических) гарантируют монотонность функции между узлами. Вычисляем  $n$  значений энергии деформации:

$$2. \quad E_{\max,i} = \int_{x_{\min}}^{x_{\max}} S_{F,i}(x) dx \tag{2}$$

Находим среднее значение  $\langle E_{\max} \rangle$  и его стандартное отклонение  $\sigma(\langle E_{\max} \rangle)$ :

$$\begin{aligned}
 \langle E_{\max} \rangle &= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n E_{\max,i} \\
 \sigma(\langle E_{\max} \rangle) &= \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (E_{\max,i} - \langle E_{\max} \rangle)^2}
 \end{aligned} \tag{3}$$

Вычисляем  $n$  значений относительной энергии диссипации  $E_{dis,i}$ :

$$4. \quad \begin{aligned} E_{\min,i} &= \int_{x_{\min}}^{x_{\max}} S_{B,i}(x) dx \\ E_{dis,i} &= \frac{E_{\max,i} - E_{\min,i}}{E_{\max,i}} \end{aligned} \quad (4)$$

Находим среднее значение  $\langle E_{dis} \rangle$  и его стандартное отклонение  $\sigma(\langle E_{dis} \rangle)$ :

$$5. \quad \begin{aligned} \langle E_{dis} \rangle &= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n E_{dis,i} \\ \sigma(\langle E_{dis} \rangle) &= \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (E_{dis,i} - \langle E_{dis} \rangle)^2} \end{aligned} \quad (5)$$

Разбиваем общую область определения реологических кривых на  $N$  узлов (в нашем случае,  $N = 400$ ) с равномерным шагом по  $x$ :

$$6. \quad \begin{aligned} \Delta x &= \frac{x_{\max} - x_{\min}}{N-1} \\ x_i &= x_{\min} + i \cdot \Delta x, i = 0 \dots N-1 \end{aligned} \quad (6)$$

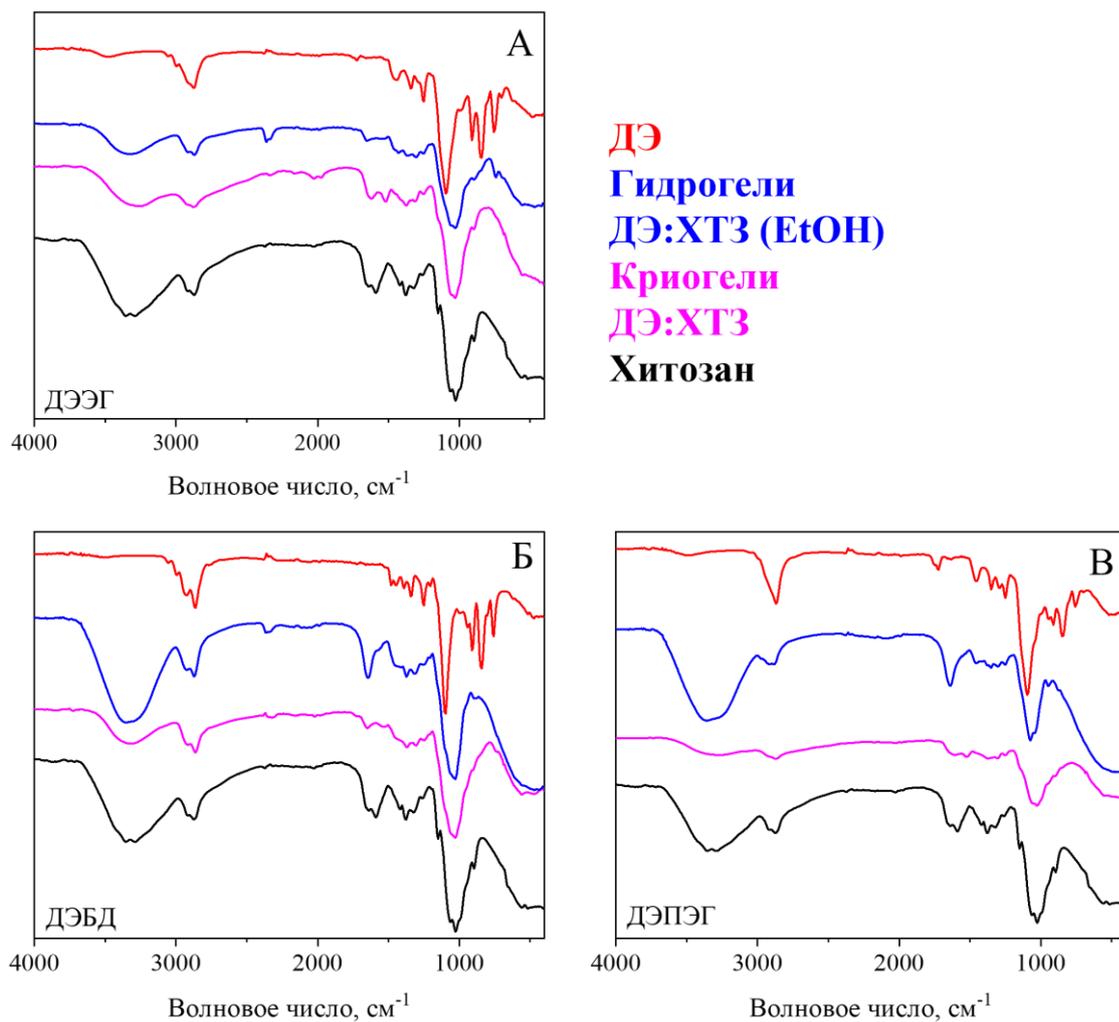
Для каждого узла  $j$  находится среднее значение для восходящей и нисходящей ветви:

$$7. \quad \begin{aligned} \langle P_F \rangle_j &= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n S_{F,i}(x_j) \\ \langle P_B \rangle_j &= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n S_{B,i}(x_j) \end{aligned} \quad (7)$$

И их стандартные отклонения:

$$8. \quad \begin{aligned} \sigma(\langle P_F \rangle_j) &= \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (S_{F,i}(x_j) - \langle P_F \rangle_j)^2} \\ \sigma(\langle P_B \rangle_j) &= \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (S_{B,i}(x_j) - \langle P_B \rangle_j)^2} \end{aligned} \quad (8)$$

## Приложение 2



Расширенный вариант ИК-Фурье спектров, представленных на рисунке 19: ИК-спектры криогелей и гидрогелей (EtOH) ДЭ:ХТЗ 1:1, полученных в солянокислых растворах при рН 5.5 сшивкой ДЭЭГ (А), ДЭБД (Б) и ДЭПЭГ (В). Спектры хитозана и ДЭ приведены для сравнения.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность своему научному руководителю чл.-корр. РАН, д.х.н. Братской С.Ю. за организацию научно-исследовательского процесса и помощь в работе; к.х.н. Голикову А.П., с.н.с. лаборатории органических и гибридных функциональных материалов (ЛОГФМ) за написание программного обеспечения для обработки реологических кривых (раздел 4.2), к.х.н. Мироненко А.Ю., с.н.с. ЛОГФМ за получение изображений композитных криогелей методом сканирующей электронной микроскопии (раздел 5.2), к.х.н. Скатовой А. В., н.с. ЛОГФМ за помощь в проведении исследований устойчивости криогелей к ферментативному гидролизу (раздел 4.3). Автор также признателен к.х.н. Пестову А.В., старшему научному сотруднику лаборатории органических материалов ИОС УрО РАН за организацию работ по исследованию биосовместимости криогелей и плодотворное сотрудничество.

Часть экспериментальных данных, использованных в данной работе, получена сотрудниками сторонних организаций, которым автор выражает глубокую благодарность. 3D культивирование клеток и исследования цитотоксичности методом проточной цитометрии выполнены к.б.н. Бородой А.В. и Малышевым Д.Д. (раздел 5.3.1), изображения пористой структуры набухших криогелей получены методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии к.б.н. Майоровой М.А. в ННЦМБ ДВО РАН (раздел 4.1). Исследования биосовместимости на животной модели (мышь) проведены к.х.н. Нестеровым Д.В., ИОС УрО РАН (раздел 5.3).