

## ПОЛУЧЕНИЕ, СТРУКТУРА И СВОЙСТВА МИКРОТРУБОК ХИТОЗАНА

© А. Б. Шиповская, Н. О. Гегель\*, Т. С. Бабичева, А. А. Голядкина

Саратовский национальный исследовательский государственный университет  
им. Н. Г. Чернышевского,  
410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83  
\* E-mail: GegelNO@yandex.ru

Поступила в Редакцию 21 ноября 2022 г.  
После доработки 10 марта 2023 г.  
Принята к публикации 5 июля 2023 г.

*Разработаны способы формирования полых цилиндрических структур с толщиной стенки в микрометровом диапазоне (микротрубок) из растворов хитозана в лимонной, молочной и гликолевой кислотах. В основе способов лежит межфазная реакция нейтрализации, индуцированная транспортом ионов (далее, ионно-индуцированная реакция), протекающая на границе раздела жидкость–жидкость или твердое тело–жидкость: реакция полимераналогичного превращения солевой формы полимера в основную в среде NaOH или триэтанолamina либо реакция формирования водонерастворимого полиэлектролитного комплекса с додецилбензосульфатом натрия. Проведен сравнительный анализ зависимости морфологических, структурных, упруго-пластических, физико-механических и биологических свойств структур от условий проведения химической реакции, природы органической кислоты и нейтрализующего реагента. Установлено, что микротрубки, полученные из раствора хитозана в гликолевой кислоте способом ионно-индуцированной нейтрализации на границе раздела твердое тело–жидкость в среде NaOH и триэтанолamina, обладают оптимальными показателями прочности и эластичности, сопоставимыми с аналогичными характеристиками фрагмента сонной артерии человека и ксеноперикардальной пластины. Гемо-, биосовместимость и контролируемая биodeградация данных образцов показывают перспективность применения полученных материалов в качестве аналогов биodeградируемых имплантов кровеносных сосудов.*

Ключевые слова: хитозан; микротрубки; межфазная реакция нейтрализации; биodeградируемые протезы кровеносных сосудов

DOI: 10.31857/S0044461823010097; EDN: HUYTKR

К настоящему времени разработан и детально исследован широкий спектр хитозансодержащих материалов разного функционального назначения, прежде всего для фармацевтических и медико-биологических приложений [1–3]. Одно из новых направлений — получение из хитозана материалов в форме полых цилиндрических структур с толщиной стенки в микрометровом диапазоне (микротрубок). Такие материалы перспективны для использования в качестве имплантатов (протезов) кровеносных сосудов, мочеточников и нервных волокон [4, 5]. Основной подход к их получению заключается в формировании полых полимерной структуры на металлическом или пластиковом темплате с круглым поперечным сечением. Например, известно получение микротрубок на

вращающемся стержневом электроде методом электроформования растворов хитозана в муравьиной, концентрированной уксусной или трифторуксусной кислотах [6, 7].

Более экологичный способ формирования микро-трубчатых конструкций предусматривает выщелачивание нанесенной на вращающуюся пластиковую трубку глицериновой эмульсии хитозан-желатиновых микросфер [8] либо адсорбированного на капиллярном шаблоне уксуснокислого раствора хитозана (в том числе армированного сеткой хитозановых волокон) с последующим сшиванием генипином [9, 10].

Еще один вариант создания трубчатых каркасов — экструзия многокомпонентных гелей на основе карбоксиметилхитозана и альгиновой кислоты в коагу-

ляционную ванну с солями кальция с последующим образованием мостиковых сшивок  $\text{Ca}^{2+}$  с полианионами для придания материалу формоустойчивости [11].

Интересен также подход к получению твердофазной трубчатой формы (прекурсора углеродных микротрубок) путем самопроизвольного скручивания тонкой пленки ацетата хитозана в водной среде при  $150^\circ\text{C}$  [12].

Описанные в данных работах способы и подходы зачастую многостадийны, энергозатратны, а в ряде случаев предполагают использование дорогостоящего оборудования и агрессивных растворяющих сред. Сказанное предопределяет разработку более экологически безопасной и экономически целесообразной технологии формирования микротрубок хитозана, предусматривающей применение сравнительно простых методических подходов и биологически активных реагентов.

Традиционно для растворения хитозана (формирования его солевой формы) используют водные растворы уксусной или соляной кислот. Поскольку основное прикладное применение хитозансодержащих материалов — фармацевтика и медицина, а природа кислотного остатка оказывает существенное влияние на структуру и свойства конечного продукта, интересным как с научной, так и с практической точки зрения является использование для растворения хитозана биологически активных органических кислот: лимонной, молочной, гликолевой, аскорбиновой, аспарагиновой и др. [13–16]. Это позволяет не только варьировать физико-химические свойства получаемых материалов, но и объединить биохимические активности полимера и кислоты.

Процесс солеобразования и структурно-морфологические характеристики материала определяются не только кислотными свойствами, значением pH и ионной силы растворяющей среды, но и молекулярной структурой и объемом кислотного остатка, определяющими силу ионного взаимодействия полимер–кислота и количество формирующихся между свободными функциональными группами Н-связей [16, 17]. Так, хитозан в пленках, полученных из растворов уксусной и соляной кислот, характеризуется аморфно-кристаллическим упорядочением, а полученных из растворов в лимонной и молочной кислотах — практически полностью аморфным надмолекулярным упорядочением [16]. Наиболее низкое значение температуры стеклования имеет цитрат хитозана, что свидетельствует о более сильном взаимодействии цитрат-ионов с  $\text{NH}_3^+$ -группами макроцепей. С увеличением объема противоиона уменьшается и разрывная

прочность материала. Авторы [17] обнаружили, что пленки, сформированные из растворов хитозана в лимонной и молочной кислотах, менее прочные, чем из раствора в уксусной кислоте. При этом образцы, полученные из растворов лактата хитозана, проявляют высокую эластичность.

Для перевода водорастворимой солевой формы хитозана в водонерастворимую основную форму проводят нейтрализацию протонированных аминогрупп, выдерживая образец в среде NaOH (другие щелочные реагенты практически не используются). Изменяя условия реакции нейтрализации, индуцированной ионами  $\text{OH}^-$ , можно получать хитозансодержащие материалы разной морфоструктуры, в том числе периодической (типа осадков Лизеганга). В частности, гидрогели со слоисто-ориентированным упорядочением получают выдерживанием раствора ацетата хитозана, помещенного в пресс-форму, в среде NaOH [18]. Ориентация слоев наблюдается вдоль направления диффузии ионов  $\text{OH}^-$ , а их количественные характеристики согласуются с феноменом Лизеганга. В работе [19] формируют гидрогели хитозана аналогичной структуры многократным чередованием депротонирования ацетата хитозана в щелочной среде с промывкой в воде вплоть до полной нейтрализации протонированных аминогрупп, что приводит к образованию периодических слоев.

Нейтрализованную водонерастворимую форму хитозана получают и посредством формирования поликомплексов с противоположно заряженными полиэлектролитами или поверхностно-активными веществами [2, 20, 21]. Не исключено, что реакции полимер-аналогичного превращения соль→основание хитозана и комплексообразования с поверхностно-активными веществами могут быть весьма результативными и при получении полых цилиндрических структур. Кроме того, представляется целесообразным варьирование природы кислоты-растворителя хитозана и нейтрализующего реагента в данном процессе.

Цель работы — получение полых цилиндрических структур из растворов хитозана в органических кислотах с использованием межфазной реакции ионно-индуцированной нейтрализации солевой формы полимера.

### Экспериментальная часть

В работе использовали хитозан со средневязкостной молекулярной массой 700 кДа и степенью деацетилирования 80 мол% (ЗАО «Биопрогресс»); биологически активные карбоновые гидроксикисло-

ты, показавшие большой потенциал при получении хитозансодержащих материалов биомедицинского назначения [15–17]: лимонную ( $\geq 99.8\%$ , АО «База № 1 Химреактивов»); молочную (80%, АО «Вектон») и гликолевую (70%, Sigma-Aldrich, кат. № 8.14662); нейтрализующие реагенты: NaOH (АО «База № 1 Химреактивов»), триэтанолламин (АО «База № 1 Химреактивов») и додецилбензосульфат натрия ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, кат. № 436143); соли NaCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (АО «База № 1 Химреактивов»); лизоцим (ООО «Медиген»); нингидрин (ООО «Диаэм»); кармуазин (краситель пищевой E122, ООО «Ялога-НТ»); дистиллированную воду, полученную на аквадистилляторе ДЭ-10М (ООО «Завод «Электромедеоборудование»); этиловый спирт (96.3%, «Экстра», ООО «Абсолют»); хлоргексидин биглюконат (0.05%, ООО «Петрофарм»). Все химические вещества квалификации х.ч.

Растворы хитозана концентрации 2.0–4.0 мас% готовили растворением воздушно-сухой навески порошка полимера в водном растворе 5%-ной лимонной, 1.5%-ной молочной и 1.5%-ной гликолевой кислот при перемешивании на магнитной мешалке в течение 5–7 ч при комнатной температуре. Выбор концентрации кислот обусловлен их растворяющей способностью в отношении хитозана и соблюдением максимального мольного соотношения кислота:полимер, не превышающего 2.0–2.2 моль:осново-моль, с целью минимизирования присутствия в системе несвязанной кислоты.

Микротрубки хитозана получали межфазной реакцией ионно-индуцированной нейтрализации (реакция полимераналогичного превращения солевой формы полимера в основную в среде 5%-ного NaOH или 50%-ного триэтанолламина) либо реакцией формирования водонерастворимого полиэлектролитного комплекса с 0.1 М додецилбензосульфатом Na, протекающей на границе раздела жидкость–жидкость (способ 1) или твердое тело–жидкость (способ 2) [22].

*Способ 1.* Раствор полимера адсорбировали на стеклянном стержне диаметром  $d = 5\text{--}10$  мм либо металлической проволоке с  $d = 0.3$  мм, погружали вертикально в раствор нейтрализующего реагента и выдерживали 12 ч до полной нейтрализации солевой формы хитозана.

*Способ 2.* Стержень с адсорбированным раствором солевого хитозана выдерживали 1 мин в нейтрализующей среде, сушили 1 ч в термошкафу ШСУ-М (ОАО «Электроприбор») при  $50^\circ\text{C}$  до формирования воздушно-сухого материала и вновь выдерживали 3–12 ч в среде нейтрализующего реагента.

Полученный образец снимали со стержня, промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и хранили в дистиллированной воде, по постоянству pH и показателя преломления которой контролировали полноту протекания реакции нейтрализации.

Некоторые образцы микротрубок хранили в этиловом спирте в течение 3 лет.

В отдельных экспериментах применяли пленки хитозана основной формы, полученные как классическим методом полива водно-кислотного раствора полимера с последующим высушиванием на воздухе и обработкой в среде NaOH, так и способом 2. Использовали также ксеноперикардальную пластину (марка «Кардиоплант», ООО «Кардиоплант») и биоматериал (фрагмент сонной артерии человека), предоставленный Саратовским городским бюро судебно-медицинской экспертизы.

Внешний вид микротрубок оценивали визуально по следующим параметрам: цвет, прозрачность, однородность внутренней и внешней поверхности. Фотографии получены с использованием цифрового фотоаппарата Sony SX 37, для контрастности микротрубки окрашивали кармуaziном. Толщину стенок измеряли микрометром СТ200-521 (ЗАО «ЧИП и ДИП»). Измерения проводили не менее 10 раз на различных участках образца и рассчитывали среднее значение.

Деформационно-прочностные характеристики определяли на одноколонной испытательной машине Instron 5944 (Instron) с нагрузочной ячейкой 500 Н в условиях одноосного растяжения со скоростью  $10\text{ мм}\cdot\text{мин}^{-1}$ . Испытания проводили в воздушно-сухой атмосфере при  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  и в жидкой среде (0.15 М NaCl — модель физиологического раствора) ванны BioBath (Instron) при  $37^\circ\text{C}$ . При испытании в воздушной среде образцы микротрубок разрезали вдоль, распрямляли и закрепляли в стандартных зажимах разрывной машины в виде пластин; в жидкой среде — образец фиксировали в специальных зажимах с сохранением исходной геометрии полого цилиндра. По полученным данным строили зависимость нагрузка–удлинение  $\sigma = f(\epsilon)$ . Разрывное напряжение ( $\sigma_r$ , МПа), модуль Юнга ( $E$ , МПа) и относительное удлинение при разрыве ( $\epsilon_r$ , %) рассчитывали с учетом площади поперечного сечения и первоначальной длины исходного образца.

Рентгеновские дифрактограммы получали на дифрактометре ДРОН-3 (АО «НПП Буревестник») с излучением  $\text{CuK}_\alpha$  при  $U = 22$  кВ и  $I_a = 20$  мА. Степень кристалличности ( $\chi$ , %) рассчитывали как отношение интегральной интенсивности суммарного рассеяния

кристаллитов к полному рассеянию от аморфных и кристаллических областей графическим интегрированием (программа IpSquare v.5.0).

Морфологию поверхности и внутренней структуры стенки микроотрубок оценивали методом сканирующей электронной микроскопии на микроскопе MIRA\LMU (Tescan) при напряжении 15 кВ и проводящем токе 400 пА. Пробоподготовку проводили следующим образом: микроотрубку надевали на стержень соответствующего диаметра, отрезали кольцо высотой 3 мм, выдерживали при  $-90^{\circ}\text{C}$  в течение 12 ч, помещали в 96.3%-ный этиловый спирт на 30 мин и сушили при комнатной атмосфере 24 ч. Перед проведением исследований на образцы напыляли слой золота толщиной 5 нм на установке K450X Carbon Coater (Quorum Technologies Ltd).

Гемосовместимость изучали *in vitro* на модели эритроцитов человека в условиях детекции окисленных форм гемоглобина [13]. Образцы микроотрубок стерилизовали в 70%-ном растворе этилового спирта в течение 20 мин, помещали в стерильные чашки Петри (FalconBD), вносили суспензию эритроцитов здоровых доноров и инкубировали на термощейкере BioSan PST 60HL (ООО «BioSan») в режиме встряхивания при  $350 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$  и  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч. Далее пробы центрифугировали на центрифуге-встряхивателе CM-70M-07 SIA (ELMI) при скорости вращения  $1000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$  в течение 10 мин и измеряли оптическую плотность супернатанта на фотометре Stat Fax 4200 (Awareness Technology) при  $\lambda = 545 \text{ нм}$ . Проводили три параллельных опыта. Степень гемолиза (%) рассчитывали по разнице оптической плотности супернатанта тестируемой системы и суспензии эритроцитов в физиологическом растворе (0.15 М NaCl, положительный контроль, 0%-ный гемолиз) с учетом оптической плотности суспензии эритроцитов в дистиллированной воде (отрицательный контроль, 100%-ный гемолиз). Тестируемый образец считали гемосовместимым при степени гемолиза менее 5%. Статистическую обработку данных проводили с применением пакета программ Statistica 6.0.

Цитотоксическое действие исследовали *in vitro* на модели клеточной линии эпителиоцитов эмбриональной почки макаки резус MA-104 (Институт цитологии РАН). Образцы стерильных микроотрубок (см. выше) помещали в стерильные чашки Петри, заливали ростовой средой DMEM (ООО «БиолоТ») с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone) и 1% смеси пенициллина со стрептомицином (РУП «Белмедпрепараты»), вносили суспензию клеточной культуры в концентрации  $1 \cdot 10^4 \text{ кл/см}^3$  и культивировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе MCO-18AIC (Sanyo) при

$37^{\circ}\text{C}$ , 90%-ной влажности и 5%  $\text{CO}_2$  в течение 7 сут. Проводили по три опытных посева. Наблюдение за адгезией и пролиферацией клеток осуществляли на инвертируемом микроскопе Биолам П (АО «ЛОМО») с цифровой CCD-камерой DMS 300 Scopotek (объектив 10X, разрешение 3 Мрх). В принятых условиях проведения опытов воспроизводимость культивирования клеток составила  $98 \pm 2\%$ .

Биодеградацию оценивали *in vitro* в процессе выдерживания микроотрубок в  $2 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  растворе фермента лизоцим или фосфатном буферном растворе (контроль,  $66.7 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 + 66.7 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 180 сут. Оптимальную концентрацию фермента и время его биокаталитической активности определяли в предварительных опытах методом диффузии в мясопептонный агар (ООО «Агат-Мед») в отношении штамма *Esherichia coli* 113-13 (Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского) по стандартной методике. Пробы отбирали через каждые 30 сут кондиционирования, выдерживали в хлоргексидине биглюконате 10 мин, промывали дистиллированной водой и сушили до воздушно-сухого состояния при комнатной температуре 24 ч. Убыль массы контролировали гравиметрически на аналитических весах Ohaus Discovery (OHAUS Corporation, точность взвешивания  $\pm 0.01 \text{ мг}$ ), морфологию поверхности — методом сканирующей электронной микроскопии, как описано выше.

### Обсуждение результатов

Были разработаны два способа получения полых цилиндрических структур.

Согласно первому способу, межфазная химическая реакция ионно-индуцированной нейтрализации протекает на границе раздела двух жидких фаз (раствор солевой формы хитозана–раствор нейтрализующего реагента), согласно второму — преимущественно на границе твердое тело–жидкость (твердообразный солевой хитозан–раствор нейтрализующего реагента). При использовании NaOH и триэтанолamina водонерастворимая форма полимера в виде полого цилиндра формировалась по механизму полимераналогичного превращения соль  $\rightarrow$  основание хитозана, додецилбензосульфата Na — по механизму нейтрализованного полиэлектролитного комплекса с поверхностно-активным веществом. Поскольку различия данных способов формирования микроотрубок значительно отражаются на морфологии, структуре и свойствах получаемых образцов, уместно их раздельное обсуждение.

Образцы, сформированные из раствора хитозана в лимонной кислоте способом 1, являются хрупкими, имеют поверхностные дефекты, а толщина их стенок и морфология образцов практически не зависят от мольного соотношения кислота:полимер (моль:осново-моль) в исходном растворе, в молочной и гликолевой кислотах — формоустойчивы, эластичны и без видимых дефектов (табл. 1; рис. 1, *a–в*). Наилучшие образцы микротрубок получены из растворов хитозана в гликолевой кислоте. Они характеризуются развитой поверхностью (рис. 2, *a*), толщина стенок составила 350–700 мкм, длина — 30–70 мм. По-видимому, большие по размерам цитрат- и лактат-анионы создают стерические затруднения для надмолекулярного упорядочения полимерного вещества по сравнению с меньшим по объему гликолят-анионом. Это приводит к различиям в морфоструктуре материала и согласуется с концепцией авторов [16] о влиянии объема противоиона на структуру и свойства пленок хитозана. Вместе с тем нельзя исключить влияние заряда макроцепи и гидрофобных взаимодействий реагентов.

Высказанное предположение подтверждается исследованием упруго-пластических характеристик образцов (рис. 3, *a*; табл. 1). Микротрубки, полученные из растворов хитозана в лимонной кислоте в среде NaOH, практически мгновенно разрушаются при приложении растягивающей силы, а сформированные в аналогичных условиях из растворов в

молочной кислоте показывают деформационно-прочностное поведение хрупких полимерных материалов (рис. 3, кривые 1 и 2). Зависимости  $\sigma = f(\epsilon)$  образцов, полученных из растворов хитозана в гликолевой кислоте в том же нейтрализующем реагенте, являются типичными для вязкопластичных систем (рис. 3, кривые 3 и 4). Однако после достижения предела текучести наблюдается плато, свидетельствующее о частичном разрушении материала.

Деформационные кривые нагрузка–удлинение микротрубок, полученных из тех же растворов гликолята хитозана, но с использованием додецилбензосульфата Na, аналогичны таковым для образцов, полученных нейтрализацией в щелочной среде: имеют участок упругой деформации, значение которой не превышает 2–3%, и «пластическую ветвь» (рис. 3, кривые 5 и 6). Особенностью являются более высокие значения  $\sigma_p$  и  $\epsilon_p$ . Во всех случаях наиболее оптимальное мольное соотношение гликолевая кислота:хитозан, обеспечивающее удовлетворительные упруго-пластические характеристики микротрубок, составило 0.9–1.1 моль:осново-моль. Тем не менее прочность материалов, полученных способом ионно-индуцированной нейтрализации солевой формы полимера на границе жидкость–жидкость, невысокая. Кроме того, отмечается неравномерность толщины стенки по длине образца вследствие стекания раствора полимера по стержню в процессе формирования полой структуры.

Таблица 1

Морфология, размерные и физико-механические характеристики микротрубок, полученных ионно-индуцированной нейтрализацией солевой формы хитозана на границе жидкость–жидкость, в зависимости от концентрации полимера в растворе, природы кислоты и нейтрализующего реагента

Состав формовочного раствора		Нейтрализующий реагент	Морфология образца микротрубки	Толщина стенки, мкм	Разрывное напряжение $\sigma_p$ , МПа	Удлинение при разрыве $\epsilon_p$ , %
концентрация хитозана, мас%	кислота					
2–4	Лимонная	NaOH	Непрозрачный, очень хрупкий	440 ± 80	—	—
2.0	Молочная		Прозрачный, хрупкий	500 ± 70	—	—
3.0			Прозрачный, эластичный	520 ± 50	0.70 ± 0.15	34.0 ± 2.0
3.5				540 ± 50	0.25 ± 0.04	23.0 ± 5.0
4.0	Гликолевая		Не формируется	—	—	—
2.5			Непрозрачный, хрупкий	400 ± 55	0.24 ± 0.07	14.0 ± 3.4
3.0				400 ± 40	0.40 ± 0.17	14.0 ± 5.4
3.5			Непрозрачный, эластичный	420 ± 40	0.83 ± 0.27	20.0 ± 7.5
4.0				700 ± 45	0.70 ± 0.20	24.0 ± 4.2
3.5	Додецилбензосульфат Na		Прозрачный, высокоэластичный	480 ± 50	1.25 ± 0.2	28.0 ± 5.2
4.0		350 ± 35		2.42 ± 0.4	30.0 ± 1.1	

Примечание. «—» — не определяли.

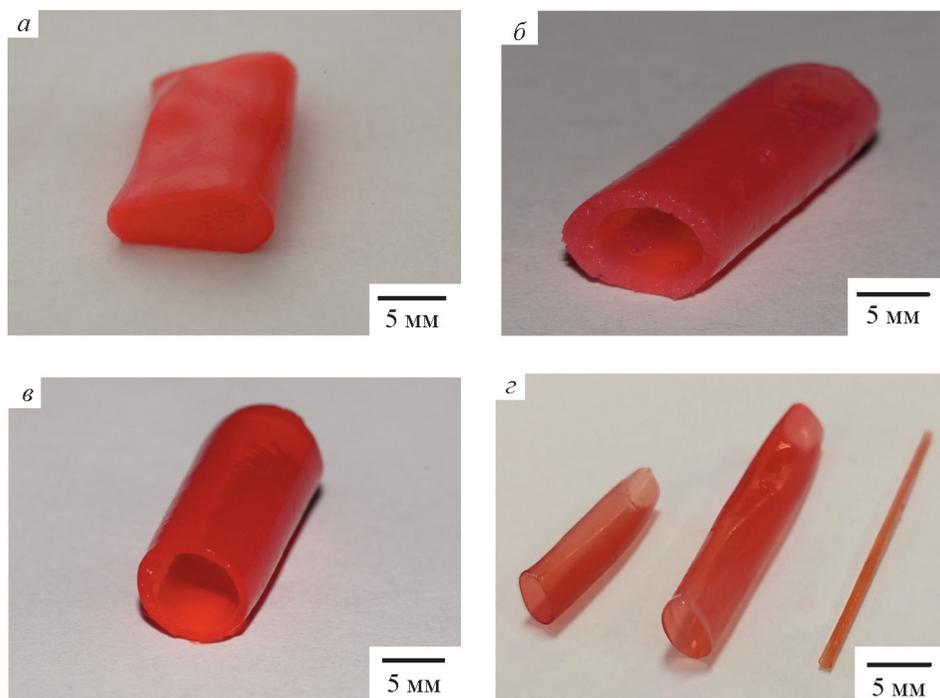


Рис. 1. Фотографии микро трубок, полученных из раствора хитозана в лимонной (*а*), молочной (*б*) и гликолевой кислотах (*в*, *з*) ионно-индуцированной нейтрализацией солевой формы полимера на границе жидкость–жидкость (*а–в*) и твердое тело–жидкость (*з*) с использованием в качестве нейтрализующего реагента NaOH (*а–в*) и пары додецилбензосульфат Na–додецилбензосульфат Na (*з*).

*з* — фотографии сделаны через 3 года хранения образцов в этиловом спирте.

Указанные недостатки устранены во втором способе получения микро трубок. Для предотвращения эффекта стекания полимерной системы на поверхности раствора хитозана формировали водонерастворимую оболочку путем кратковременного выдерживания стержневого темплата с адсорбированным полимером в нейтрализующем реагенте. Поскольку одним из способов упрочнения хитозансодержащих продуктов является термообработка [24], введен этап сушки образца. Далее темплат с твердофазным солевым хитозаном повторно подвергали ионно-индуцированной нейтрализации. Вследствие двухэтапного формирования водонерастворимой формы полимера использовали как одинаковые, так и разные сочетания нейтрализующих реагентов (NaOH–NaOH, триэтаноламин–NaOH, триэтаноламин–додецилбензосульфат Na и додецилбензосульфат Na–додецилбензосульфат Na). Для дальнейших исследований выбраны растворы хитозана в гликолевой кислоте, из которых способом 1 был получен бездефектный материал с удовлетворительными механическими свойствами.

Микро трубки, сформированные двухэтапной ионно-индуцированной нейтрализацией гликолята хитозана на границе твердое тело–жидкость, как и полученные из растворов того же состава на границе

жидкость–жидкость, характеризуются формоустойчивостью, эластичностью и отсутствием дефектов (рис. 1, *з*; табл. 2). Толщина стенки (160–275 мкм) и отклонения в значениях толщины по длине образца существенно меньше, а сочетание нейтрализующих реагентов разной химической природы существенно влияет на поверхностную морфоструктуру и пористость образцов. Так, использование органического и неорганического оснований на первом и втором этапах нейтрализации сопровождается формированием пористой структуры с размером пор 0.90–1.47 мкм. Замена NaOH на втором этапе на додецилбензосульфат Na также приводит к получению развитой структуры, но с меньшим размером пор 0.80–0.95 мкм. Применение NaOH и додецилбензосульфата Na на обоих этапах нейтрализации приводит к формированию практически гладкой поверхности (рис. 2, *в*).

Микро трубки, сформированные способом 2 с использованием в качестве нейтрализующей среды пары триэтаноламин–NaOH или NaOH–NaOH, являются вязкопластичными материалами с более высокой долей упругой (~4–5%) и высокоэластической деформации (рис. 3, *б*, кривые 1 и 2), чем полученные способом 1. Образцы, нейтрализованные в среде триэтаноламин–додецилбензосульфат Na (кривая 3) или

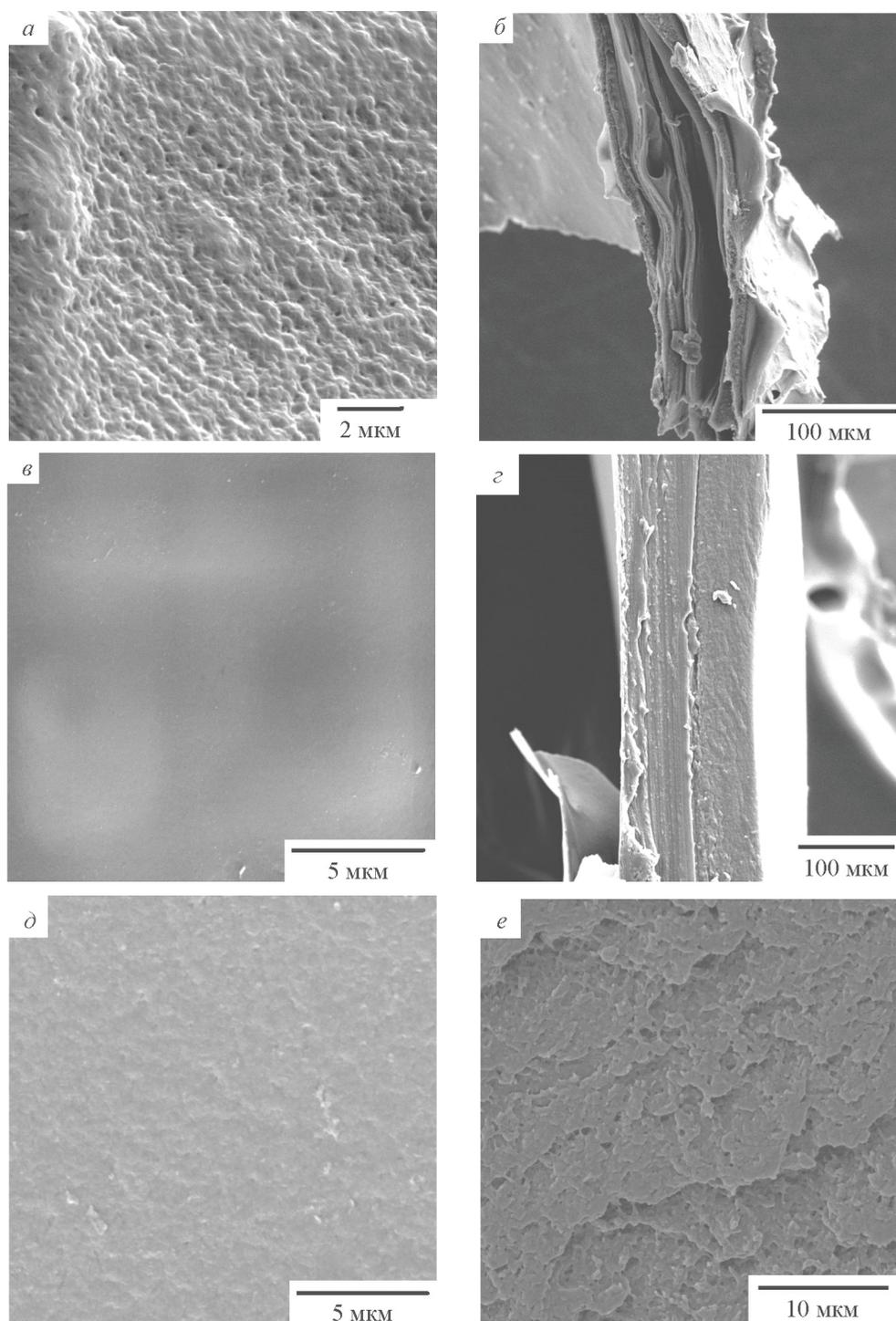


Рис. 2. Изображения, полученные методом сканирующей электронной микроскопии, поверхности (*a*, *в*, *д*, *е*) и структуры стенки (*б*, *з*) микротрубок, полученных из 4.0 мас%-ного раствора хитозана в гликолевой кислоте ионно-индуцированной нейтрализацией солевой формы полимера на границе жидкость–жидкость в среде NaOH (*a*, *б*) и на границе твердое тело–жидкость с использованием NaOH–NaOH (*в–е*).

Образцы: *a–г* — исходные, *д*, *е* — после 120 и 180 сут биорезорбции в ферментативной среде лизоцима.

додецилбензосульфат Na–додецилбензосульфат Na (кривая 4), проявляют вынужденно-эластическое деформирование вязкоупругих полимерных систем. Данные образцы деформируются при растяжении с

образованием шейки вследствие ориентационного упорядочения материала. Как и в первом способе, наибольшую прочность и эластичность демонстрируют образцы микротрубок, полученные из растворов

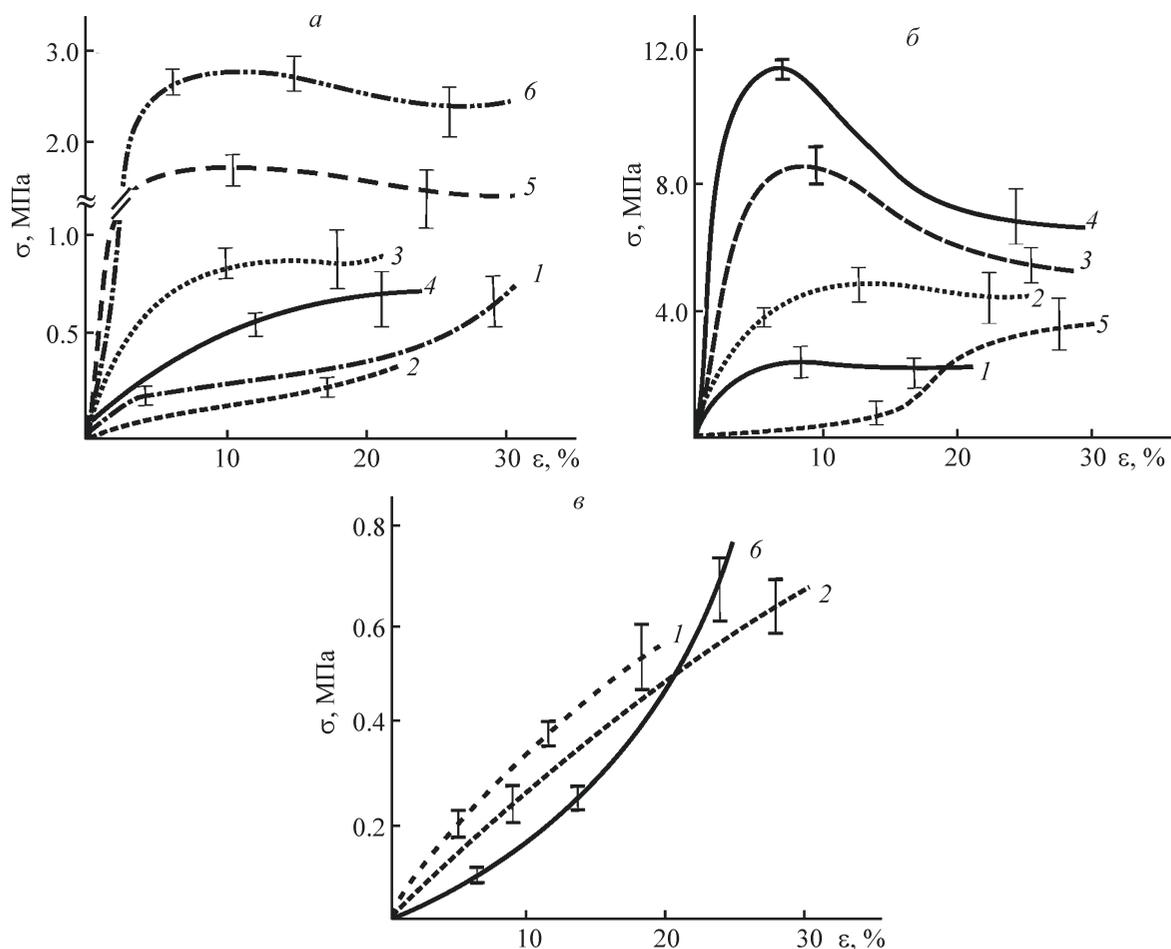


Рис. 3. Зависимость нагрузка–удлинение в воздушной атмосфере при  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  (а, б) и физиологическом растворе при  $37^\circ\text{C}$  (в) образцов микротрубок, полученных ионно-индуцированной нейтрализацией солевой формы полимера на границе жидкость–жидкость (а) и твердое тело–жидкость (б, в).

Образцы: а — микротрубки, полученные из 3.0 (1), 3.5 (2, 3, 5) и 4.0 мас%-ных (4, б) растворов хитозана в молочной (1, 2) и гликолевой кислотах (3–6) в среде NaOH (1–4) и додецилбензосульфата Na (5, б); б, в — микротрубки, полученные из 4.0 мас%-ного раствора хитозана в гликолевой кислоте с использованием двухэтапной нейтрализации в среде триэтанолмин–NaOH (1), NaOH–NaOH (2), триэтанолмин–додецилбензосульфат Na (3) и додецилбензосульфат Na–додецилбензосульфат Na (4); пластина ксеноперикардальная (5); биоматериал (фрагмент сонной артерии человека) (6) [23].\*

при мольном соотношении кислота:полимер = 0.9–1.1 моль:осново-моль.

Значения  $\sigma_p$  всех образцов, сформованных способом 2, значимо выше по сравнению с полученными способом 1, а  $\epsilon_p$  — в большинстве случаев сопоставимы (табл. 2). Как и морфоструктура поверхности, прочностные показатели зависят от природы нейтрализующего реагента. Существенно более прочные образцы получены с использованием додецилбензосульфата Na. Вместе с тем нейтрализация в среде

поверхностно-активного вещества понижает модуль Юнга по сравнению с триэтаноламином и NaOH. Представляется, что такой характер изменения физико-механических свойств в зависимости от природы нейтрализующей среды обусловлен структурными особенностями конденсированной полимерной фазы. Вследствие депротонизации макроклабков в процессе получения материала в среде NaOH и триэтанолamina образуется уплотненная надмолекулярная структура, стабилизированная развитой системой меж- и внутримолекулярных контактов. При использовании мицеллярного раствора поверхностно-активного вещества (с концентрацией додецилбензосульфата Na существенно выше критической концентрации мицеллообразования) формируется более рыхлая

\* Разрешение на повторную публикацию материалов от авторов Голядкина А. А., Иванова Д. В., Кириллова И. В., Коссович Л. Ю., Павлова О. Е., Полиенко А. В., Сафонова Р. А. получено 24.07.2023.

Таблица 2

Морфология, размерные и физико-механические параметры микротрубок, полученных из 4.0 мас%-ного раствора хитозана в гликолевой кислоте двухэтапной ионно-индуцированной нейтрализацией солевой формы полимера на границе твердое тело–жидкость

Сочетание нейтрализующих реагентов на этапах формирования водонерастворимой формы полимера	Морфология образца микротрубки	Толщина стенки, мкм	Разрывное напряжение $\sigma_r$ , МПа	Модуль Юнга $E$ , МПа	Удлинение при разрыве $\epsilon_r$ , %
Испытания в воздушной среде					
Триэтанолламин–NaOH	Непрозрачный, эластичный	160 ± 25	1.8 ± 0.7	1.60 ± 0.46	20.5 ± 7.2
NaOH–NaOH		180 ± 25	4.8 ± 2.2	0.93 ± 0.31	26.1 ± 6.4
Триэтанолламин–додецилбензосульфат Na	Прозрачный, эластичный	255 ± 30	5.9 ± 2.1	0.25 ± 0.16	27.7 ± 8.6
Додецилбензосульфат Na–додецилбензосульфат Na		275 ± 40	6.6 ± 1.7	0.65 ± 0.23	29.5 ± 5.1
Ксеноперикард*	Непрозрачный, эластичный	280 ± 15	3.7 ± 0.9	29.8 ± 6.2	30.0 ± 2.0
Испытания в модельной водной среде (0.15 M NaCl)					
Триэтанолламин–NaOH	Непрозрачный, эластичный	160 ± 25	0.55 ± 0.21	33.0 ± 2.4	20.7 ± 1.2
NaOH–NaOH		180 ± 25	0.62 ± 0.34	38.0 ± 3.2	30.6 ± 3.4
Внутренняя сонная артерия (биоматериал) [23]*	Непрозрачный, эластичный	125 ± 15	0.73 ± 0.13	35.2 ± 2.1	24.8 ± 2.5

надмолекулярная структура из мицеллоподобных кластеров полиэлектролитных комплексов, характеристические размеры которых определяются средним расстоянием между мицеллоподобными агрегатами [2]. Так, например, размер таких полостей при иотропном гелеобразовании хитозана в присутствии додецилсульфата Na может достигать 3.5–7.5 нм [20].

Деформационно-прочностное поведение микротрубок в условиях, максимально приближенных к нативным, оказалось аналогичным деформированию сонной артерии (рис. 3, в; табл. 2). При одноосном растяжении в имитирующей плазму крови модельной водной среде (0.15 M NaCl) после начального прямолинейного участка ( $\epsilon < 5\text{--}7\%$ ) реализуется участок пластической деформации без выраженной площадки текучести. Значения разрывной прочности, модуля Юнга и удлинения при разрыве микротрубок и трубчатого биооргана практически совпадают. Значения  $\sigma_r$  и  $\epsilon_r$  данных образцов микротрубок, сопоставимые с коммерческим образцом ксеноперекардиальной пластины, зафиксированы и при растяжении в воздушной атмосфере (рис. 3, б, кривая 5; табл. 2).

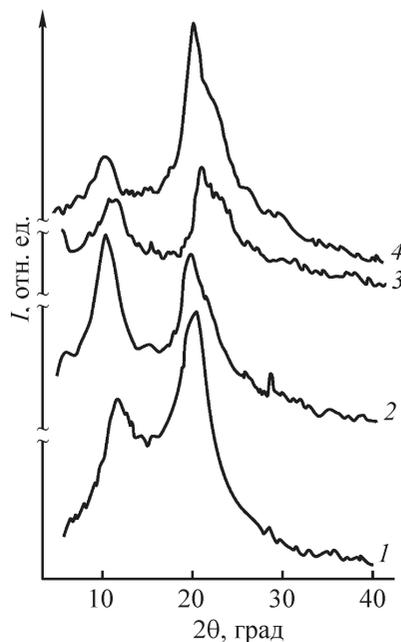


Рис. 4. Рентгеновские дифрактограммы исходного порошка хитозана (1), микротрубки (2) и основных пленок хитозана (3, 4), полученных из 4.0 мас%-ного раствора полимера в гликолевой кислоте ионно-индуцированной нейтрализацией солевой формы полимера на границе твердое тело–жидкость с использованием NaOH–NaOH (2, 3) и методом полива на горизонтальную подложку с последующей сушкой и нейтрализацией в среде NaOH (4).

\* Разрешение на повторную публикацию материалов от авторов Голядкина А. А., Иванова Д. В., Кириллова И. В., Коссович Л. Ю., Павлова О. Е., Полиенко А. В., Сафонова Р. А. получено 24.07.2023.

Таблица 3

Межплоскостные расстояния в кристаллитах и степень кристалличности образцов хитозана разной морфологической формы

Образец хитозана	Способ получения	Угол дифракции $2\theta$ , град	Межплоскостное расстояние $d$ , Å	Степень кристалличности $\chi$ , %
Порошок	Деацетилирование хитина в гетерогенных условиях в среде NaOH	11.80	7.500	40.0
		20.50	4.332	
		29.50	3.280	
Микротрубка	Двухэтапная нейтрализация гликолята хитозана на искривленной поверхности на границе раздела твердое тело–жидкость в среде NaOH–NaOH (способ 2)	10.70	8.270	61.9
		20.30	4.375	
		29.40	3.038	
Пленка основной формы	Двухэтапная нейтрализация гликолята хитозана на плоской поверхности на границе раздела твердое тело–жидкость в среде NaOH–NaOH (способ 2)	11.00	8.043	59.6
		15.00	5.906	
		20.80	4.270	
		22.20	4.004	
		23.50	3.789	
		26.50	3.243	
	Одноэтапная нейтрализация гликолята хитозана на плоской поверхности на границе раздела твердое тело–жидкость в среде NaOH (традиционный способ получения пленок хитозана основной формы)	10.70	8.270	55.8
		20.40	4.353	
		22.80	3.900	
		26.75	3.331	
		28.40	3.143	
		29.50	3.028	

Следует также отметить, что микротрубки, полученные способом 2, устойчивы при длительном хранении. Выдерживание в этиловом спирте в течение трех лет практически не изменяет морфоструктуру (рис. 1, *з*) и физико-механические показатели образцов.

Рентгеновские дифрактограммы микротрубок, исходного порошка и пленок хитозана основной формы, для сравнения полученных способом 2 и традиционным способом высушивания раствора на плоской поверхности в воздушной атмосфере, практически идентичны: на фоне аморфного гало проявляются перекрывающиеся рефлексы при  $2\theta \sim 10.7^\circ\text{--}11.8^\circ$  и  $20.3^\circ\text{--}20.8^\circ$ , характерные для кристаллической структуры полиморфных модификаций полимера (рис. 4; табл. 3). Тем не менее наблюдаются различия в интенсивности рефлексов, значениях межплоскостных расстояний и степени кристалличности образцов. Так, при малых  $2\theta$  интенсивность рефлекса для материала микротрубки и порошка сопоставима, но существенно больше, чем для пленок. При этом межплоскостные расстояния в полимерной фазе микротрубки и пленок соизмеримы и больше, чем в полимерной фазе порошка. При больших  $2\theta$  наиболее интенсивные рефлексы наблюдаются для порошка и

пленки основной формы, полученной методом полива, а значения  $d$  в кристаллитах всех морфологических форм хитозана различаются незначительно. Степень кристалличности микротрубки (61.9%) и пленок (55.8–59.6%) значительно выше по сравнению с исходным порошком (40.0%). Это свидетельствует о формировании более ориентированной структуры полимера в данных образцах и является типичным при перекристаллизации хитозана в щелочной среде [24, 25]. Наибольшее значение  $\chi$  наблюдается для микротрубки. Следовательно, микротрубчатые субстраты отличаются более упорядоченной надмолекулярной структурой с более развитой системой Н-связей.

Еще одна особенность — внутренняя структура стенки микротрубок представлена слоисто-ориентированным упорядочением. Наиболее ярко выраженная слоистая структура наблюдается для образцов, полученных способом 1 с использованием NaOH (рис. 2, *б*) или триэтанолamina. Толщина слоев составляет 0.5–4.5 мкм, расстояние между слоями варьируется в диапазоне 1.5–8 мкм. Введение дополнительного этапа сушки (способ 2) не изменяет характер слоисто-периодического упорядочения, но приводит к формированию более уплотненной структуры об-

разцов (рис. 2, з). Тем не менее разделенность слоев сохраняется, что говорит о самостоятельном формировании каждого слоя. В экспериментах по изучению диффузии гидроксид-ионов в растворе гликолята хитозана в отсутствие конвекции и перемешивания установлено, что межфазная реакция соль  $\rightarrow$  основание, лежащая в основе получения полых цилиндрических структур, протекает по механизму поэтапного депротонирования поликатиона, что и приводит к формированию многослойной структуры полимерного материала [15]. Данный процесс описывается классическими закономерностями ионно-обменных

реакций, а соотношение положений периодических слоев и кинетика их образования описываются законом времени и пространства, характерным для явления Лизеганга [18].

На основании полученных результатов механизм массопереноса в процессе нейтрализации солевой формы хитозана при получении микротрубок представляется следующим. Рассмотрим его на примере реакции полимераналогичного превращения соль  $\rightarrow$  основание хитозана в щелочной среде на границе жидкость-жидкость. Вследствие значимого различия вязкости растворов реагирующих веществ

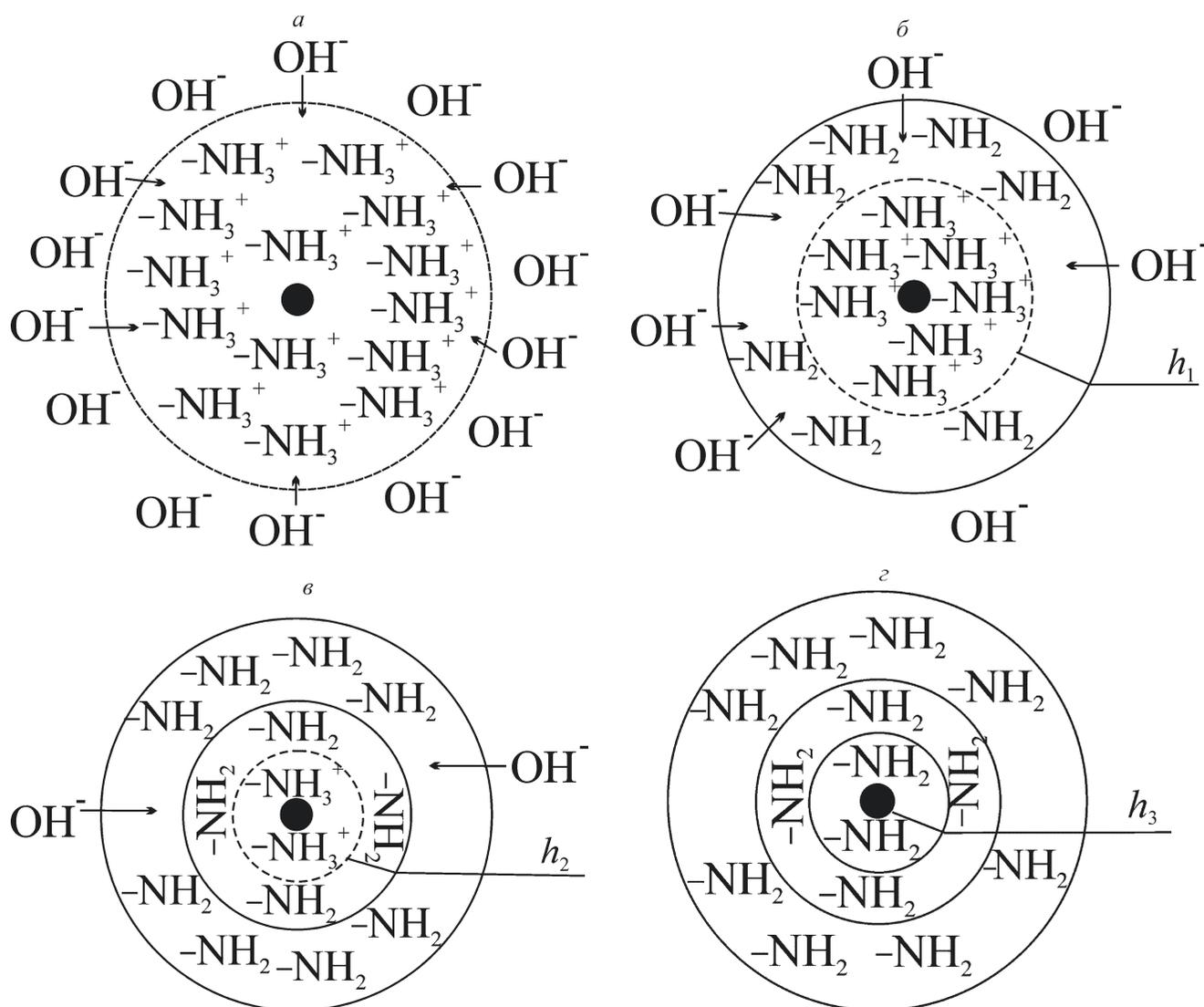


Рис. 5. Схематическое представление начального (а), промежуточных (б, в) и конечного этапов (з) ионно-индуцированной нейтрализации солевой формы хитозана на границе жидкость-жидкость в среде NaOH, протекающей при получении микротрубок.

Черным кругом изображено поперечное сечение стержневого темплата; стрелками показано направление диффузии гидроксид-ионов;  $h_1, h_2, h_3$  — ширина пространственно-разделенных слоев основания хитозана [22].\*

\* Journal of Soft Matter, Creative Commons Attribution License.

контакт адсорбированного на темплате солевого хитозана с NaOH приводит к образованию на границе раздела двух жидких фаз диффузионного барьера, препятствующего хаотическому перемешиванию жидкостей и соответственно встречной диффузии реагентов (рис. 5, а). Однонаправленная диффузия ионов  $\text{OH}^-$  и депротонирование  $\text{NH}_3^+$ -групп сегментов макроцепей сопровождается формированием первичного водонерастворимого слоя в виде полупроницаемой полимерной мембраны (рис. 5, б, кольцевой слой шириной  $h_1$ ). По мере протекания реакции граница мембрана–раствор полимера перемещается вдоль направления диффузии ионов  $\text{OH}^-$  с образованием пространственно-разделенных слоев основания хитозана (рис. 5, в, г, кольцевые слои шириной  $h_2$  и  $h_3$ ).

При протекании реакции полимераналогичного превращения на границе раздела твердое тело–жидкость массоперенос в процессе однонаправленной диффузии  $\text{OH}^-$ -ионов в солевой форме хитозана происходит аналогично реакции на границе жидкость–жидкость, но ввиду нейтрализации твердой фазы поликатиона сопровождается уменьшением ширины гидрогелевых слоев и межслоевого пространства и соответственно формированием уплотненной слоисто-упорядоченной организации материала.

Поскольку одним из направлений практического использования микротрубок хитозана является медицина, выполнены оценки их биологических свойств. Исследование гемосовместимости показало, что степень гемолиза эритроцитов при контакте с микротрубчатыми субстратами зависит от химической природы используемого нейтрализующего реагента (рис. 6). Так, гемолиз эритроцитов при контакте с

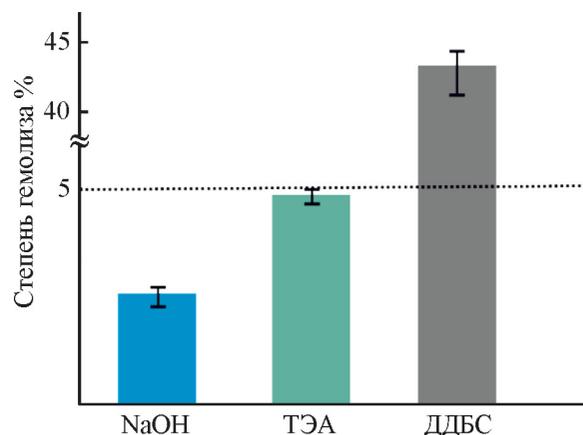


Рис. 6. Степень гемолиза эритроцитов в присутствии микротрубок хитозана, полученных из 4.0 мас%-ного раствора хитозана в гликолевой кислоте ионно-индуцированной нейтрализацией солевой формы полимера на границе жидкость–жидкость с использованием NaOH, триэтаноламина (ТЭА) и додецилбензосульфата Na (ДДБСН).

Пунктиром показано максимально допустимое значение степени гемолиза, характерное для гемосовместимых материалов.

образцами, полученными способом 1 с использованием NaOH и триэтаноламина, составил  $1.6 \pm 0.8$  и  $4.0 \pm 1.0\%$  соответственно, что не превышает максимально допустимые значения данной величины для гемосовместимых материалов. Значительно более высокая степень гемолиза,  $42.0 \pm 4.0\%$ , наблюдается для образцов, сформированных тем же способом в среде додецилбензосульфата Na, что может быть обусловлено разрушением целостности клеточной мембраны вследствие взаимодействия липидных

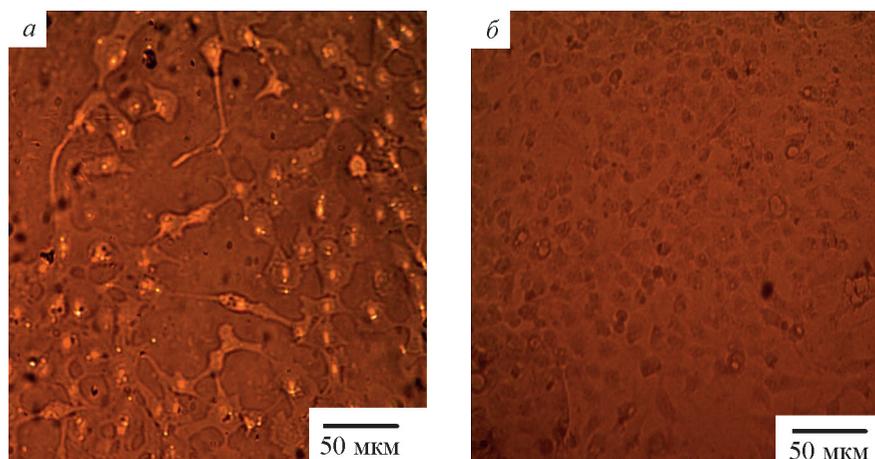


Рис. 7. Эпителиоциты почки эмбриона макаки (МА-104) через 4 (а) и 7 сут (б) культивирования на поверхности микротрубки, полученной из 4.0 мас%-ного раствора хитозана в гликолевой кислоте двухэтапной ионно-индуцированной нейтрализацией солевой формы полимера на границе твердое тело–жидкость с использованием триэтаноламин–NaOH.

участков эритроцитов и гидрофобных хвостовых групп анионного поверхностно-активного вещества [26]. Показатели гемосовместимости в зависимости от природы нейтрализующей среды для полученных способом 2 микротрубок аналогичны.

Оценена цитотоксичность гемосовместимых микротрубок на примере культуры эпителиоподобных клеток МА-104 (рис. 7). Для всех образцов наблюдается адгезия и пролиферация эпителиоцитов на поверхности микротрубчатых субстратов. Формирование полного монослоя клеточной культуры МА-104 наблюдается в среднем на 7-е сутки культивирования, что свидетельствует об отсутствии токсичности и биосовместимости образцов.

При исследовании биодеградации установлено, что выдерживание микротрубок в среде лизоцима сопровождается изменением их микрорельефа от изначально гладкой (рис. 2, в) до ярко выраженной рыхлой поверхности (рис. 2, д, е), а также уменьшением массы полимерного вещества. Например, убыль массы микротрубки, полученной способом 2 с использованием пары триэтанолламин–NaOH, составила ~8 и ~20–25% за 30 и 180 сут инкубации соответственно, с использованием двухэтапной нейтрализации в среде NaOH–NaOH – ~12 и ~30–35%. В среде фосфатного буферного раствора (контрольный эксперимент) значимого изменения морфоструктуры поверхности образцов не наблюдается, а убыль массы за весь срок эксперимента не превышает ~5–7%. Результаты качественной реакции Руэманна с нингидрином показали наличие в составе ферментативного гидролизата низкомолекулярных продуктов со свободными аминогруппами и их отсутствие в составе буферного гидролизата. Следовательно, деградация микротрубчатых субстратов в ферментативной среде протекает по механизму разрыва  $\beta$ -(1, 4)-гликозидной связи, что согласуется с результатами работ [27, 28], а в буферном растворе — лишь за счет растворения низкомолекулярных фракций. Исходя из экспериментальных количественных показателей, а также учитывая биокаталитическую активность лизоцима и других гидролаз, можно предположить, что полная биорезорбция микротрубок в естественной метаболической среде наступит в среднем через 8–12 мес. Этого времени вполне достаточно для восстановления живой ткани протезированного органа.

### Выводы

Микротрубки хитозана, полученные с использованием межфазных реакций ионно-индуцированной нейтрализации (полимераналогичного превраще-

ния соль → основание хитозана или формирования полиэлектролитного комплекса) на границе твердое тело–жидкость, отличаются от полученных в условиях протекания химической реакции на границе жидкость–жидкость равномерностью толщины стенки по длине образца и высокими механическими характеристиками. Микротрубчатые субстраты, сформированные в среде NaOH и триэтанолламина, характеризуются слоисто-упорядоченной структурой, демонстрируют деформационно-прочностное поведение вязкопластичных полимерных материалов, нецитотоксичны, гемо- и биосовместимы.

Результаты исследования морфологии, структуры, физико-механических и биохимических свойств микротрубок хитозана показывают перспективы их использования в медико-биологических приложениях, в частности, в качестве биодеградируемых сосудистых трансплантатов для замены поврежденных участков кровеносных сосудов, мочеточников и других трубчатых образований живого организма. Такие материалы предполагают кратковременное нахождение в организме вследствие биодеградации естественным метаболическим путем и максимально возможное восстановление клеточного состава поврежденной ткани или даже части органа.

Предложенные способы получения микротрубок хитозана на цилиндрическом темплате выгодно отличаются от представленных в литературе сравнительно простыми методологическими приемами и возможностью создавать полые цилиндрические структуры с заранее заданными толщиной и физико-химическими характеристиками.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность центру коллективного пользования «Физико-химические методы исследования и анализа веществ и материалов» Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского за анализ образцов микротрубок методами сканирующей микроскопии и рентгеновской дифрактометрии.

### Финансирование работы

Финансовая поддержка работы осуществлялась в рамках госзадания Минобрнауки России в сфере научной деятельности № 4.1212.2014/К, грантов Фонда содействия инновациям № 4276ГУ1/2014 и Российского фонда фундаментальных исследований № 16-33-00953.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### Информация о вкладе авторов

А. Б. Шиповская сформулировала цель и обосновала задачи исследования; А. Б. Шиповская, Н. О. Гегель и Т. С. Бабичева разработали план эксперимента; Н. О. Гегель и Т. С. Бабичева получили микротрубки хитозана; Н. О. Гегель, Т. С. Бабичева и А. А. Голядкина провели исследование физико-механических свойств микротрубок; А. А. Голядкина оценила физико-механические свойства ксеноперикардальной пластины и фрагмента сонной артерии человека; Т. С. Бабичева изучила гемосовместимость микротрубчатых субстратов; Н. О. Гегель провела исследование цитотоксичности и биосовместимости микротрубок; А. Б. Шиповская и Н. О. Гегель участвовали в написании статьи.

### Информация об авторах

Шиповская Анна Борисовна, д.х.н, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1916-4067>

Гегель Наталья Олеговна, к.х.н.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5724-7571>

Бабичева Татьяна Сергеевна, к.х.н.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6655-8483>

Голядкина Анастасия Александровна, к.ф.-м.н.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0587-8691>

### Список литературы

- [1] Wang J., Zhuang S. Chitosan-based materials: Preparation, modification and application // *J. Clean. Prod.* 2022. V. 355. ID 31825. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131825>
- [2] Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications // *Progress Polym. Sci.* 2006. V. 31. N 7. P. 603–632. <https://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- [3] Мударисова Р. Х., Кулиш Е. И., Зинатуллин Р. М., Таминдарова Н. Э., Колесов С. В., Хунафин С. Н., Монаков Ю. Б. Пленки комплексов на основе хитозана с контролируемым высвобождением левомецетина // *ЖПХ.* 2006. Т. 79. № 10. С. 1737–1739. EDN: HVKFJH [Mударисова Р. К., Kulish E. I., Zinatullin R. M., Tamindarova N. E., Kolesov S. V., Khunafin S. N., Monakov Y. B. Films of chitosan-based complexes with controlled release of levomycetin // *Russ. J. Appl. Chem.* 2006. V. 79. N 10. P. 1718–1720. <https://doi.org/10.1134/S107042720610034X>].
- [4] Li X., Tang J., Bao L., Chen L., Hong F. F. Performance improvements of the BNC tubes from unique double-silicone-tube bioreactors by introducing chitosan and heparin for application as small-diameter artificial blood vessels // *Carbohydr. Polym.* 2017. V. 178. P. 394–405. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.120>
- [5] Yin K., Divakar P., Wegst U. G. K. Freeze-casting porous chitosan ureteral stents for improved drainage // *Acta Biomater.* 2019. V. 84. P. 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.005>
- [6] Al Rez M. F., BinObaid A., Alghosen A., Mirza E., Alam J., Hashem M., Alsalman H., Almalak H. M., Mahmood A., Moussa I., Al-Jassir F. F. Tubular poly( $\epsilon$ -caprolactone)/chitosan nanofibrous scaffold prepared by electrospinning for vascular tissue engineering applications // *J. Biomater. Tissue Eng.* 2017. V. 7. P. 427–436. <https://doi.org/10.1166/jbt.2017.1593>
- [7] Попрядухин П. В., Юкина Г. Ю., Суслов Д. Н., Добровольская И. П., Иванькова Е. Н., Юдин В. Е. Биорезорбция пористых 3D-материалов на основе хитозана // *Цитология.* 2016. Т. 58. № 10. P. 771–777. EDN: XWRWWD
- [8] Badhe R. V., Bijukumar D., Chejara D. R., Mabrouk M., Choonara Y. E., Kumar P., du Toit L. C., Kondiah P. P. D., Pillay V. A composite chitosan-gelatin bi-layered, biomimetic macroporous scaffold for blood vessel tissue engineering // *Carbohydr. Polym.* 2017. V. 157. P. 1215–1225. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.095>
- [9] Zhao X., Liu S., Han Y., Wang Y., Lin Q. Preparation of 5-fluorouracil loaded chitosan microtube via *in situ* precipitation for glaucoma drainage device application: *in vitro* and *in vivo* investigation // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2021. V. 32. N 14. P. 1849–1864. <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1946460>
- [10] Macêdo M. D. M., de Lucena B. M., de Cerqueira G. R. C., de Sousa W. J. B., Pedrosa T. C., Barbosa R. C., de Azevedo A. C. S., de Souza M. F., de Oliveira D. K. M., Fook M. V. L. Tubular chitosan device for use as prosthesis coating in vascular surgery // *Res. Soc. Develop. [S. I.]*. 2021. V. 10. N 4. P. e25610414031. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.14031>
- [11] Neufurth M., Wang X., Tolba E., Dorweiler B., Schröder H. C., Link T., Diehl-Seifert B., Muller W. E. G. Modular small diameter vascular grafts with bioactive functionalities // *PLoS ONE.* 2015. V. 10. N 7. P. e0133632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133632>
- [12] Beda A., Yamada H., Egunov A., Ghimbeu C. M., Malval J. P., Saito Y., Luchnikov V. Carbon microtubes derived from self-rolled chitosan acetate films and graphitized by joule heating // *J. Mater. Sci.* 2019. V. 54. N 16. P. 11345–11356. <https://doi.org/10.1007/s10853-019-03675-6>

- [13] *Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B., Shmakov S. L., Shipenok X. M.* Formation, structure, properties of chitosan aspartate and metastable state of its solutions for obtaining nanoparticles // *Carbohydr. Polym.* 2022. V. 277. ID 118773. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118773>
- [14] *Шиповская А. Б., Малинкина О. Н., Гегель Н. О., Зудина И. В., Луговицкая Т. Н.* Структура и свойства солевых комплексов хитозана с диастереомерами аскорбиновой кислоты // *Изв. АН. Сер. хим.* 2021. № 9. С. 1765–1774. EDN: TVLXSM [*Shipovskaya A. B., Malinkina O. N., Gegel N. O., Zudina I. V., Lugovitskaya T. N.* Structure and properties of chitosan salt complexes with ascorbic acid diastereomers // *Russ. Chem. Bull.* 2021. V. 70. N 9. P. 1765–1774. <https://doi.org/10.1007/s11172-021-3281-5>].
- [15] *Babicheva T. S., Konduktorova A. A., Shmakov S. L., Shipovskaya A. B.* Formation of Liesegang structures under the conditions of the spatiotemporal reaction of polymer-analogous transformation (salt→base) of chitosan // *J. Phys. Chem. B.* 2020. V. 124. N 41. P. 9255–9266. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07173>
- [16] *Qiao C., Ma X., Wang X., Liu L.* Structure and properties of chitosan films: Effect of the type of solvent acid // *LWT.* 2021. V. 135. ID 109984. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109984>
- [17] *Melro E., Antunes F. E., da Silva G. J., Cruz I., Ramos P. E., Carvalho F., Alves L.* Chitosan films in food applications. Tuning film properties by changing acidic dissolution conditions // *Polymers.* 2021. V. 13. N 1. ID 1. <https://doi.org/10.3390/polym13010001>
- [18] *Nie J., Lu W., Ma J., Yang L., Wang Z., Qin A., Hu Q.* Orientation in multi-layer chitosan hydrogel: Morphology, mechanism and design principle // *Sci. Reports.* 2015. V. 5. N 1. P. 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep07635>
- [19] *Li B., Gao Y., Feng Y., Ma B., Zhu R., Zhou Y.* Formation of concentric multilayers in a chitosan hydrogel inspired by Liesegang ring phenomena // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2011. V. 22. N 17. P. 2295–2304. <https://doi.org/10.1163/092050610X538425>
- [20] *Babak V. G., Merkovich E. A., Galbraikh L. S., Shtykova E. V., Rinaudo M.* Kinetics of diffusionally induced gelation and ordered nanostructure formation in surfactant–polyelectrolyte complexes formed at water/water emulsion type interfaces // *Mendeleev Commun.* 2000. V. 10. N 3. P. 94–95. <https://doi.org/10.1070/MC2000v010n03ABEH001227>
- [21] *Базунова М. В., Мустакимов Р. А., Бакирова Э. Р.* О формировании устойчивых полиэлектролитных комплексов на основе N-сукцинила хитозана и поли-N,N-диаллил-N,N-диметиламмоний хлорида // *ЖПХ.* 2022. Т. 95. № 1. С. 42–48. <https://doi.org/10.1134/S1070427222010062> [*Bazunova M. V., Mustakimov R. A., Bakirova E. R.* Conditions of formation of stable polyelectrolyte complexes based on N-succinyl chitosan and poly-N,N-diallyl-N,N-dimethylammonium chloride // *Russ. J. Appl. Chem.* 2022. V. 95. N 1. P. 46–52. <https://doi.org/10.31857/S0044461822010054>].
- [22] *Gegel N. O., Shipovskaya A. B., Vdovykh L. S., Babicheva T. S.* Preparation and properties of 3D chitosan microtubes // *J. Soft Matter.* 2014. V. 2014. ID 863096. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/863096>
- [23] *Голядкина А. А., Иванов Д. В., Кириллова И. В., Коссович Е. Л., Павлова О. Е., Полиенко А. В., Сафонов Р. А.* Биомеханика сонной артерии. Саратов: Саратовский источник, 2015. С. 70. EDN: VIKBJR
- [24] *Агеев Е. П., Вихорева Г. А., Зоткин М. А., Матушкина Н. Н., Герасимов В. И., Зезин С. Б., Оболонкова Е. С.* Структура и транспортные свойства хитозановых пленок, модифицированных термообработкой // *Высокомолекуляр. соединения.* 2004. Т. 46А. № 12. С. 2035–2041. EDN: NEMWOV [*Ageev E. P., Vikhoreva G. A., Zotkin M. A., Matushkina N. N., Gerasimov V. I., Zezin S. B., Obolonkova E. S.* Structure and transport behavior of heat-treated chitosan films // *Polym. Sci. Ser. A.* 2004. V. 46. N 12. P. 1245–1250].
- [25] *Shipovskaya A. B., Shmakov S. L., Gegel N. O.* Optical activity anisotropy of chitosan-based films // *Carbohydr. Polym.* 2019. V. 206. P. 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.026>
- [26] *Жанкалова З. М.* Показатели перекисного окисления липидов у больных с алкогольной болезнью печени // *Медицина и экология.* 2008. Т. 48. № 3. P. 31–33. <https://qmu.edu.kz/media/qmudoc/Journal3-08.pdf>
- [27] *Zhang L., Dou S., Li Y., Yuan Y., Ji Y., Wang Y., Yang Y.* Degradation and compatibility behaviors of poly (glycolic acid) grafted chitosan // *Mater. Sci. Eng. Part C.* 2013. V. 33. N 5. P. 2626–2631. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.02.024>
- [28] *Кулиш Е. И., Чернова В. В., Володина В. П., Колесов С. В.* Биodeградация пленочных полимерных покрытий на основе хитозана // *Вестн. Башкир. ун-та.* 2008. Т. 13. № 1. С. 23–26. EDN: IPVEKV