

ПРИВИВКА НЕНАСЫЩЕННЫХ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ К ХИТОЗАНУ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

© И. А. Фарион¹, В. Ф. Бурдуковский¹, Б. Ч. Холхоев¹, П. С. Тимашев^{2,3},
К. Н. Бардакова^{2,3}, Ю. В. Герасимов⁴, А. Г. Грошева⁴, Н. Н. Воробьева², Р. К. Чайлахян^{2,4}

¹ Байкальский институт природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, д. 6

² Институт фотонных технологий Федерального научно-исследовательского центра
«Кристаллография и фотоника» РАН,
124190, г. Троицк (Москва), ул. Пионерская, д. 2

³ Институт регенеративной медицины Первого московского государственного медицинского
университета им. И. М. Сеченова РАН,
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8–2

⁴ Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи,
123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18
E-mail: fariv@mail.ru

Поступила в Редакцию 22 мая 2019 г.
После доработки 29 сентября 2019 г.
Принята к публикации 14 декабря 2019 г.

Взаимодействием хитозана с ненасыщенными высшими жирными кислотами в подкисленной водной среде и в присутствии смеси гидрохлорида N-этил-N'-(диметиламинопропил)карбодиимида с N-гидроксисукцинимидом получены привитые амиды со степенью модификации, достигающей 9%. Продукты нерастворимы в водных растворах одноосновных кислот, а лишь способны набухать, образуя гидрогели, максимальная степень набухания которых составляет 1442%. Гидрогели демонстрируют хорошую биосовместимость и адгезию мультипотентных стромальных клеток костного мозга, что определяет их перспективность для дизайна скаффолдов-носителей клеток.

Ключевые слова: хитозан; ненасыщенные высшие жирные кислоты; модификация полимеров; гидрогели; биоимплантаты-скаффолды

DOI: 10.31857/S0044461820030135

Аминополисахарид хитозан и его функционализированные производные привлекают внимание исследователей в области регенеративной медицины для дизайна имплантатов-скаффолдов [1–3]. Одним из способов функционализации являются реакции ацилирования хитозана карбоновыми кислотами или их производными [4–19]. В работе [18] была проведена серия экспериментов по модификации хитозана ангидридами карбоновых кислот с различной длиной углеводородного остатка в среде водного метанола с целью придать совместимость хитозану с клетками крови. Авторы статьи показали, что увеличение

длины углеводородного остатка в привитых к макромолекуле хитозана амидах карбоновых кислот приводит к возрастанию совместимости с клетками крови, при этом формирование нерастворимых гидрогелей происходит при меньших степенях модификации. Учитывая данный факт, вполне разумно предположить, что для модификации хитозана с целью придания перечисленных свойств при наименьших степенях модификации перспективно использование высших жирных кислот, в том числе и ненасыщенных.

Преимуществом ненасыщенных высших жирных кислот (НВЖК) со связями HC=CH в *cis*-конфигура-

ции перед насыщенными твердыми аналогами является их жидкое агрегатное состояние при нормальных условиях, благоприятствующее эмульгированию и соответственно равномерному распределению в реакционной массе при проведении реакций. Кроме того, сами НВЖК являются экологически чистыми веществами природного происхождения, которые, как известно, являются продуктом омыления растительных масел.

Необходимо отметить, что сведения о модификации хитозана карбоновыми кислотами, в том числе НВЖК, исключительно в водной среде в отсутствие токсичных органических соразтворителей имеются в ограниченном количестве.

Целью работы являлась модификация хитозана смесью НВЖК в среде нетоксичного и доступного растворителя — воды и изучение биологической совместимости привитых производных, а также адгезии к ним мультипотентных стромальных клеток костного мозга человека.

Экспериментальная часть

Исходные реагенты и растворители. Хитозан (200 кДа, степень деацетилирования 95%, содержание основного вещества 90%; ЗАО «Биопрогресс», г. Москва). Смесью ненасыщенных высших жирных кислот ($\rho = 0.914 \text{ г}\cdot\text{мл}^{-1}$; содержание, мас%: 70 — линоленовой, 25 — линолевой и 5 — олеиновой; Sigma-Aldrich, США), после использования хранилась в атмосфере аргона в темном месте. Выбор смеси НВЖК обосновывается тем, что она дешевле и доступнее, чем индивидуальные НВЖК, ввиду того, что разделение данной смеси на компоненты требует дополнительных затрат. Гидрохлорид N-этил-N'-(диметиламинопропил)карбодиимида (Sigma-Aldrich, США) после использования хранился в атмосфере аргона в темном месте. N-Гидроксисукцинимид (Sigma-Aldrich, США). Додецилсульфат натрия, $n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3\text{Na}$ (Sigma-Aldrich, США). Водный раствор HCl (х.ч., 35% HCl; ОАО «Башкирская содовая компания», г. Стерлитамак). Ацетон (ч.д.а.), толуол (х.ч.) и циклогексан («чистый») (ЗАО «Экос-1», г. Москва). CH_3COOH и HCOOH (х.ч.; ЗАО «Химреактив», г. Нижний Новгород). Водный раствор NH_3 (ч.д.а., 25% NH_3 ; ЗАО «Реактив», г. Ангарск). Фосфатно-солевой буферный раствор (ЗАО «ЛенРеактив», г. Санкт-Петербург).

Приборы и оборудование. ИК-спектры были получены на спектрометре ALPNA Bruker, Германия, в таблетках с KBr. KBr был обезвожен при 600°C в течение 1 сут и хранился в эксикаторе над P_2O_5 .

Образцы в таблетках с KBr подготавливали следующим образом. Обезвоженный KBr (600 мг) тщательно перетирали в агатовой ступке с исследуемым образцом (6 мг). Полученную порошкообразную смесь запрессовывали в таблетку, которую выдерживали в вакуум-шкафу при $70\text{--}80^\circ\text{C}$ в течение 1 сут. Перед съемкой ИК-спектров образцы хранились в эксикаторе над P_2O_5 . Культивирование мультипотентных стромальных клеток проводилось в CO_2 -инкубаторе NU-4950, NuAire, США.

Модификация хитозана ненасыщенными высшими жирными кислотами. Мольное соотношение НВЖК:элементарные звенья хитозана = 1:1. В трехгорлую колбу емкостью 250 мл, снабженную мешалкой, помещали хитозан (5.70 г, 0.03136 осн.-ново-моль), дистиллированную воду (80 мл) и оставляли на ночь в инертной атмосфере. Затем также в инертной атмосфере добавляли додецилсульфат натрия (0.22 г), перемешивали в токе аргона в течение 1 ч и добавляли НВЖК в количестве 9.58 мл (8.7535 г, 0.03136 моль) и интенсивно перемешивали в течение 1 ч. К полученной смеси добавляли раствор N-гидроксисукцинимид (3.6074 г, 0.03136 моль) в 8 мл дистиллированной воды, перемешивали в течение 20 мин, добавляли 0.3 мл 35%-ного водного раствора HCl и продолжали перемешивание при 20°C до образования однородной вязкой массы, к которой в один прием добавляли раствор гидрохлорида N-этил-N'-(диметиламинопропил)карбодиимида (6.0117 г, 0.03136 моль) в 8 мл холодной дистиллированной воды, интенсивно перемешивали реакционную массу 3–4 мин, быстро выдавливали в герметично закрываемую форму из полипропилена с инертной атмосферой и оставляли на 1 сут при $20\text{--}25^\circ\text{C}$. Образовавшуюся реакционную массу осторожно помещали в 800 мл водного раствора 2%-ной CH_3COOH и оставляли на ночь. После этого гидрогель был декантирован, промыт дистиллированной водой и снова залит 800 мл 2%-ной CH_3COOH . Данную операцию повторяли 4–5 раз. Затем гидрогель выдерживали в дистиллированной воде 3 сут, после этого в 25%-ном водном растворе NH_3 в течение 3 сут и многократно промывали дистиллированной водой до pH 6–7. Завершающую стадию очистки проводили обработкой дистиллированной водой в аппарате Сокслета ($74\text{--}76^\circ\text{C}$, 1 сут). Перед съемкой ИК-спектров образцы обезвоживали сначала промывкой ацетоном, потом циклогексаном с последующим высушиванием в вакууме. Окончательное обезвоживание было осуществлено азеотропной отгонкой воды с толуолом с последующим удалением толуола в вакууме при нагревании. Степень прививки НВЖК

к хитозану составляла 9%. Аналогично проводили модификацию хитозана НВЖК при мольном соотношении НВЖК:элементарные звенья хитозана = 1:7. Степень прививки НВЖК к хитозану составляла 4%.

Клеточные испытания сколлапсированных гидрогелей на основе модифицированного НВЖК хитозана. Испытания сколлапсированных гелей модифицированного хитозана проводили в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации. *In vitro* исследовали устойчивость пребывания образцов в культуральной среде, адгезию и рост на них мультипотентных стромальных клеток (МСК) костного мозга человека, *in vivo* определяли их биосовместимость. Получение штаммов МСК костного мозга человека проводили по методике, описанной в [20].

Испытания на биосовместимость. Испытания были проведены на мышах-самцах линии СВА массой 20–22 г. Для получения МСК костного мозга мышей или кроликов их усыпляли эфиром, с соблюдением правил асептики выделяли бедренные кости, обрезали концы и шприцем вымывали костный мозг во флакон с питательной средой. Дальнейшие действия были аналогичны процедурам при получении штаммов МСК костного мозга человека. С целью определения биосовместимости фрагменты сколлапсированных гелей были трансплантированы под капсулу почки мышей как с адгезированными на них аутологичными МСК мышей, так и без клеток [21].

Все манипуляции проводили при соблюдении правил гуманного обращения с животными в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, требованиями национального руководства и руководства учреждения по содержанию и использованию лабораторных животных.

Обсуждение результатов

Известно большое количество способов модификации хитозана карбоновыми кислотами или их производными.

Для исчерпывающей функционализации полисахаридов используются высокореакционные галоидангидриды кислот. В частности, взаимодействие хитозана с избытком хлорангидрида гексановой кислоты в среде хлороформа и в присутствии пиридина приводит к полному ацилированию всех групп ОН и NH₂ элементарных звеньев [19], при этом с группой

NH₂ реагируют 2 моль хлорангидрида с образованием привитого линейного диацетиламида. Еще один пример использования галоидангидридов описан в работе [13], где для получения привитого сложного эфира хондроитин-сульфата и α-линоленовой кислоты использовался хлорангидрид данной кислоты. В то же время из-за чувствительности галоидангидридов к влаге необходимо тщательно высушивать как модифицируемые полисахариды, так и растворители.

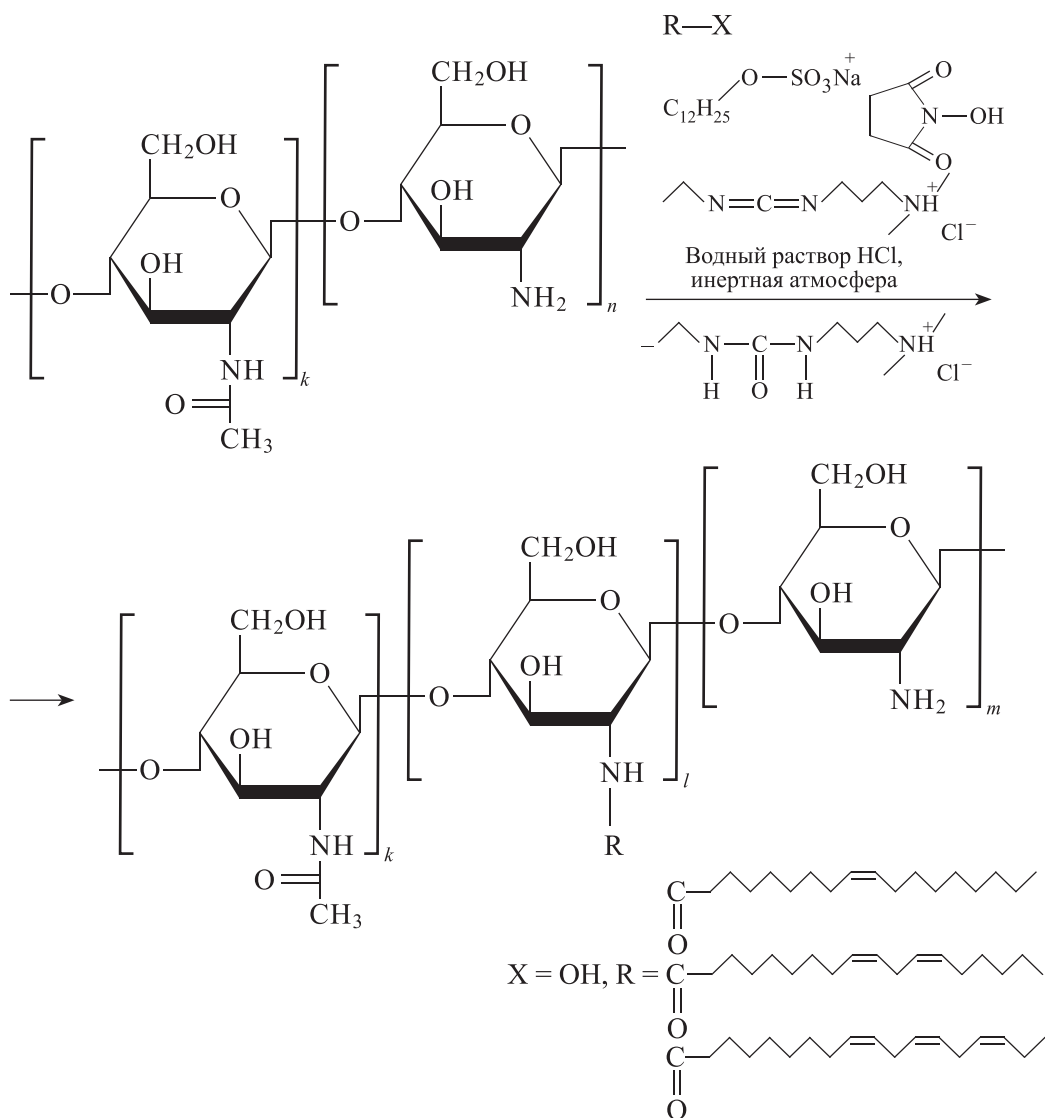
Циклические или линейные ангидриды дикарбоновых или монокарбоновых кислот являются ацилирующими реагентами с умеренной реакционной способностью и менее чувствительны к гидролизу, чем галоидангидриды. При твердофазных реакциях в условиях сдвиговых деформаций такие циклические ангидриды, как малеиновый, янтарный и фталевый, проявляют хорошую реакционную способность по отношению к хитозану, образуя привитые амидокислоты [5]. Ввиду меньшей чувствительности к гидролизу реакции с участием циклических ангидридов могут быть проведены в смеси вода–органический растворитель, например, в водно-метанольных средах даже при повышенных температурах [17]. В таких же средах были реализованы реакции ацилирования хитозана линейными ангидридами карбоновых кислот, содержащими в алкильном радикале 1–5 атомов углерода [18], причем ацилирование проходит по аминогруппам элементарных звеньев с образованием только привитых амидов в отличие от вышеприведенного примера с хлорангидридами [19]. В то же время при использовании линейных ангидридов монокарбоновых кислот в реакцию вовлекается только 1 моль ацильного фрагмента. К тому же циклические и особенно линейные ангидриды низших карбоновых кислот токсичны и обладают сильным раздражающим действием.

Свободные карбоновые кислоты, наоборот, имеют крайне низкую ацилирующую способность, особенно по отношению к группам ОН. С группами NH₂ элементарных звеньев хитозанов они образуют привитые аммониевые соли, которые при нагревании в сочетании со сдвиговыми деформациями (механическое воздействие) превращаются в привитые амиды [4, 5]. При этом для нормального протекания подобной твердофазной реакции хитозана со свободными карбоновыми кислотами необходим значительный мольный избыток данных кислот по отношению к элементарным звеньям аминополисахаридов наряду с жесткими условиями реакции, которые могут вызвать деструкцию полисахаридов. Следует также обратить внимание еще на один важный момент — такая высшая жирная кислота, как стеариновая, в

этих условиях вообще не образует привитых амидов в отличие от других исследованных низших моно- и дикарбоновых кислот [5]. Поэтому для ацилирования высшими жирными кислотами в мягких условиях перспективно использование распространенных в последнее время таких конденсирующих агентов-активаторов, как карбодиимиды. Карбодиимиды могут применяться либо одни, либо в смесях с диалкиламинопипридинами или N-гидроксисукцинимидом [6–12]. При этом использование N-гидроксисукцинимидом

в качестве сореагента предпочтительно ввиду его нетоксичности.

С учетом вышеизложенного нами был предложен подход к модификации высокомолекулярного хитозана НВЖК в водной среде при комнатной температуре в присутствии гидрохлорида N-этил-N'-(диметиламинопропил)карбодиимида, конденсирующего агента-активатора, совместно с N-гидроксисукцинимидом по следующей схеме:



Минимальное количество солилизатора, HCl, подбиралось таким образом, чтобы было протонировано количество групп NH_2 , достаточное для растворения исходного хитозана при наличии необходимого числа свободных групп NH_2 , реагирующих с НВЖК.

По причине связывания HCl группами NH_2 хитозана с образованием полимерной соли и проведения процесса при низких температурах кислотный гидро-

лиз макромолекул хитозана по гликозидным связям исключен. Водные растворы низших карбоновых кислот, таких как $HCOOH$ и CH_3COOH , не использовались в качестве солилизаторов из-за возможных конкурирующих с НВЖК реакций ацилирования групп NH_2 .

При реакции хитозана с НВЖК происходит ацилирование групп NH_2 и как результат образование

привитых амидов. Это подтверждается тем, что полоса Амид I в модифицированных образцах при 1637 см^{-1} на ИК-спектрах (рис. 1) имеет намного большую оптическую плотность в максимуме по отношению к полосе при 1078 см^{-1} из серии характеристических полос деформационных колебаний углеводного скелета в области $820\text{--}1220\text{ см}^{-1}$, а также к характерной полосе симметричных деформационных колебаний связи C–H в CH_2 при 1385 см^{-1} по сравнению с аналогичной полосой Амид I в исходном хитозане, принадлежащей остаточным ацетиламидным группам в «хитиновых» элементарных звеньях. Все это свидетельствует об успешном протекании процесса модификации хитозана НВЖК. Кроме того,

в модифицированных хитозанах становится более отчетливой полоса Амид II с плечом при 1560 см^{-1} . Полосы деформационных колебаний связей N–H при 1603 см^{-1} , соответствующие остаточным (неацелированным) группам NH_2 в модифицированных образцах, не проявляются из-за перекрытия сильной полосой Амид I. В то же время полоса группы NH_2 при 1603 см^{-1} отчетливо наблюдается в спектре исходного хитозана.

Степень модификации привитого хитозана с учетом доли ацетильных групп в исходном хитозане 5% была рассчитана по уравнению (1), где для расчетов были использованы данные ИК-спектроскопии согласно методике [22]:

$$DS_{\text{chit_mod}} = AcFract_{\text{chit_mod}} \frac{D_{\text{Amide_I_Sample}} D_{\text{refer_Chit_init}}}{D_{\text{Amide_I_Chit_init}} D_{\text{refer_Sample}}} - AcFract_{\text{chit_init}}, \quad (1)$$

где $DS_{\text{chit_mod}}$ и $AcFract_{\text{chit_init}}$ — степень модификации хитозана НВЖК и доля ацетиламидных групп в исходном хитозане соответственно (%); $D_{\text{Amide_I_Sample}}$ и $D_{\text{Amide_I_Chit_init}}$ — оптические плотности в максимуме ИК-полос поглощения при 1637 см^{-1} (валентные C=O, Амид-1) модифицированного и исходного хитозана соответственно; $D_{\text{refer_Sample}}$ и $D_{\text{refer_Chit_init}}$ — оптические плотности в максимуме ИК-полос по-

глощения при 1078 см^{-1} (валентные асимметричные C–O–C глюкопиранозных циклов) модифицированного и исходного хитозана соответственно.

Так, максимальное значение степени модификации 9% удается достичь при мольном соотношении НВЖК:элементарные звенья хитозана = 1:1. В то же время при мольном соотношении 1:7 получается привитое производное со степенью модификации 4%.

Степени модификации 4 и 9% в достаточной мере отличаются от теоретически возможных, таких как 14 и 100% при соотношениях 1:7 и 1:1 соответственно. Факт образования привитых производных с меньшими степенями модификации можно объяснить пространственными затруднениями, создаваемыми длинными углеводородными фрагментами привитых НВЖК и образованием гидрофобной сетки за счет взаимодействия данных фрагментов НВЖК по типу «жирная капля» в сильнополярной реакционной среде. По-видимому, подобные гидрофобные сетки на поздних стадиях реакции захватывают молекулы НВЖК через углеводородные фрагменты, препятствуя их диффузии к элементарным звеньям хитозана.

Необходимо отметить, что наибольшая степень модификации, достигнутая в нашем случае, сопоставима с [8, 9], где прививку линоленовой кислоты осуществляли к низкомолекулярному хитозану (5–20 кДа) при очень большом, 10 и 100-кратном, избытке N-этил-N'-(диметиламинопропил)карбодиимида по отношению к линоленовой кислоте в водно-ацетоновых или водно-этанольных смесях при $60\text{--}80^\circ\text{C}$. В данных случаях большой мольный избыток N-этил-N'-(диметиламинопропил)карбодиимида был необходим, по-видимому, из-за склонности его

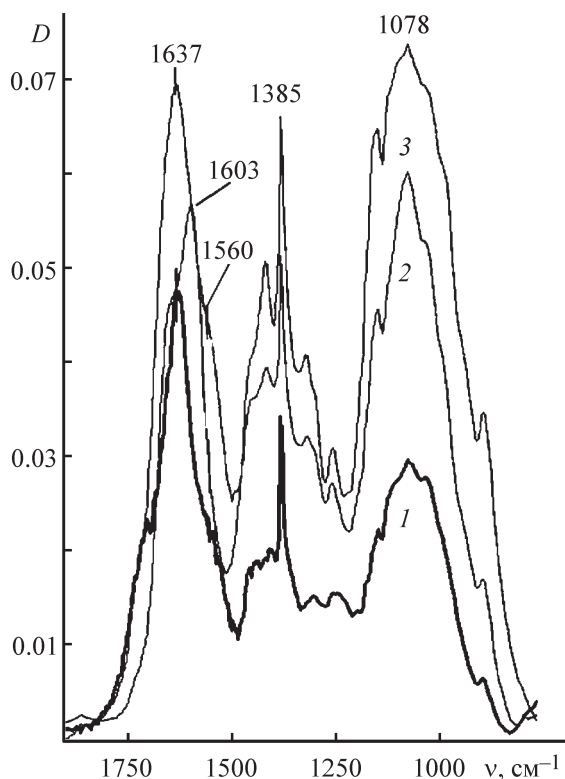


Рис. 1. ИК-спектры (в таблетках с KBr) хитозанов: со степенью модификации 9 (1), 4% (2) и исходного (3).

конъюгатов с карбоновыми кислотами к различным побочным процессам при повышенных температурах и в отсутствие N-гидроксисукцинимид. Все полученные привитые производные низкомолекулярных хитозанов были растворимы в подкисленной водной среде с образованием агрегатов-мицелл.

Полученный нами продукт с наибольшей степенью модификации 9% не растворяется в 2%-ном водном растворе CH_3COOH . Это, очевидно, связано с сильным увеличением гидрофобности макромолекул модифицированного НВЖК хитозана из-за наличия боковых длинных углеводородных фрагментов НВЖК, а также уменьшением количества свободных аминогрупп по причине их ацилирования. Образцы с небольшими степенями модификации также не растворяются, но уже способны набухать.

Степень набухания α образца со степенью модификации 4% в 0.5%-ном водном растворе CH_3COOH рассчитывали по уравнению

$$\alpha = \frac{m - m_0}{m_0} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где m и m_0 — массы набухшего и исходного образцов соответственно (г).

Наибольшая степень набухания при сохранении целостности в сильнонабухшем состоянии характерна для производного со степенью модификации 4%. Кинетика набухания приведена на рис. 2, из которого видно, что после 190 мин от начала процесса происходит выход значения α на «плато», а максимальное значение α составляет 1442% после 740 мин. При использовании 1–4%-ных водных растворов CH_3COOH происходило разрушение образца, вероятно, из-за более высокой скорости набухания поверхностных слоев по сравнению с внутренними, что приводило к сильным напряжениям и как следствие к отслаиванию

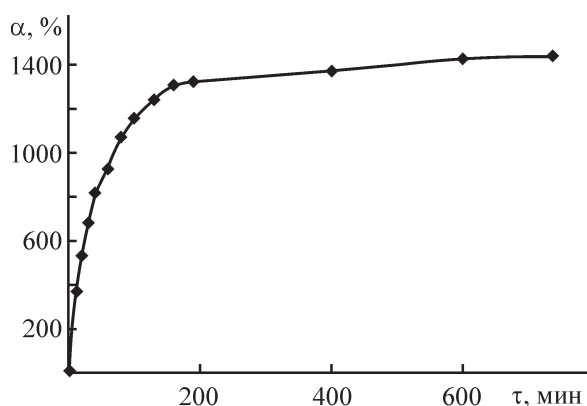


Рис. 2. Кинетика набухания гидрогеля со степенью модификации 4% в 0.5%-ном водном растворе CH_3COOH .

фрагментов с поверхности. В то же время выдерживание гидрогелей в 2%-ных растворах CH_3COOH сразу после синтеза не приводило к фрагментации их поверхностных слоев, поскольку образцы в этом случае не были обезвожены, что не создавало сильных напряжений при последующем набухании.

При испытании образцов сколлапсированного геля со степенью модификации 4% на адгезию МСК костного мозга человека и их биологическую совместимость уже через несколько часов можно было наблюдать адгезированные и делящиеся клетки, а через неделю культивации наблюдался интенсивный рост клеток. После этого образцы с клетками были перенесены в чистые лунки с новой культуральной средой и выдержаны дополнительно 1 неделю, при этом происходил процесс дополнительного роста клеток. Биосовместимость разработанных материалов, трансплантируемых под капсулу почки мышей как с адгезированными на них аутологичными МСК, так и без клеток, была удовлетворительной, воспаления вокруг трансплантатов не было. В образцах, содержащих МСК, наблюдалось активное депонирование фосфатов кальция. Таким образом, можно сделать заключение о перспективности применения модифицированных НВЖК хитозанов в регенеративной медицине в качестве биоимплантатов-скаффолдов.

Выводы

Разработан метод прививки ненасыщенных высших жирных кислот к хитозану в присутствии конденсирующей системы — гидрохлорид N-этил-N'-(диметиламинопропил)карбодиимида/N-гидроксисукцинимид. Привитые амиды с максимальной степенью прививки 9% нерастворимы и не набухают в подкисленных водных средах, тогда как образцы с небольшой степенью прививки 4% способны образовывать гидрогели со степенью набухания 1442%, обладающие хорошей биологической совместимостью и адгезией к ним мультипотентных стромальных клеток костного мозга человека.

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-15-00042 (синтез и биологические испытания полученных привитых производных хитозана) и в рамках государственного задания Байкальского института природопользования СО РАН (определение степеней модификации и набухания производных хитозана).

Конфликт интересов

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

Информация об авторах

Фарион Иван Александрович, к.х.н., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2723-6569>

Бурдуковский Виталий Федорович, д.х.н., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3104-3591>

Холхоев Бато Чингисович, к.х.н., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5963-1099>

Тимашев Петр Сергеевич, д.х.н., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7773-2435>

Бардакова Ксения Николаевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3942-5706>

Герасимов Юрий Викторович, к.б.н., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2517-30933>

Грошева Алла Германовна, к.б.н., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0951-5380>

Воробьева Наталия Николаевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6698-1460>;

Чайлахян Рубен Карпович, д.м.н., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4005-9790>

Список литературы

- [1] *Costa-Pinto A. R., Reis R. L., Neves N. M.* Scaffolds based bone tissue engineering: The role of chitosan // *Tissue Eng.: Part B.* 2011. V. 17. N 5. P. 331–347. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0704>
- [2] *Mathews S., Gupta P. K., Bhonde R., Totey S.* Chitosan enhances mineralization during osteoblast differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, by upregulating the associated genes. // *Cell Prolif.* 2011. V. 44. P. 537–549. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2011.00788.x>
- [3] *Oh J., Kim K., Won S. W., Cha C., Gaharwar A. K., Selimović Š., Bae H., Lee K. H., Lee D. H., Lee S.-H., Khademhosseini A.* Microfluidic fabrication of cell adhesive chitosan microtubes // *Biomed. Microdevices.* 2013. V. 15. P. 465–472. <https://doi.org/10.1007/s10544-013-9746-z>
- [4] *Демина Т. С., Акопова Т. А., Владимиров Л. В., Щеголихин А. Н., Кечекьян А. С., Перов Н. С., Чернышенко А. О., Зеленецкий А. Н.* Исследование взаимодействия хитозана и 2,2-бис-(гидроксиметил)пропионовой кислоты в условиях твердофазного синтеза // *Высокомолекуляр. соединения.* 2011. Т. 53Б. № 6. С. 995–1008 [Demina T. S., Akopova T. A., Vladimirov L. V., Shchegolikhin A. N., Kechek'yan A. S., Perov N. S., Chernyshenko A. O., Zelenetskii A. N. The study of the interaction between chitosan and 2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid during solid-phase synthesis // *Polym. Sci. Ser. B.* 2011. V. 53. N 5–6. P. 358–370. <https://doi.org/10.1134/S1560090411060030>].
- [5] *Rogovina S. Z., Vikhoreva G. A., Akopova T. A., Gorbacheva I. N., Zelenetskii S. N.* Reactions of chitosan with solid carbonyl-containing compounds under shearing deformation conditions // *Mend. Comm.* 1998. V. 8. N 3. P. 107–109. <https://doi.org/10.1070/MC1998v008n03ABEH000923>
- [6] *Riva R., Ragelle H., Rieux A., Duhem N., Jérôme C., Préat V.* Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering // *Adv. Polym. Sci.* 2011. V. 244. P. 19–44. https://doi.org/10.1007/12_2011_137
- [7] *Du Y.-Z., Lu P., Zhou J.-P., Yuan H., Hu F.-Q.* Stearic acid grafted chitosan oligosaccharide micelle as a promising vector for gene delivery system: Factors affecting the complexation // *Int. J. Pharm.* 2010. V. 391. P. 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.017>
- [8] *Du Y.-Z., Wang L., Yuan H., Hu F.-Q.* Linoleic acid grafted chitosan oligosaccharide micelles for intracellular drug delivery and reverse drug resistance of tumor cells // *Int. J. Biol. Macromol.* 2011. V. 48. P. 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.11.005>
- [9] *Du Y.-Z., Wang L., Yuan H., Wei X.-H., Hu F.-Q.* Preparation and characteristics of linoleic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles as a carrier for doxorubicin // *Coll. Surf. B: Biointerfaces.* 2009. V. 69. P. 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.11.030>
- [10] *Ye Y.-Q., Yang F.-L., Hu F.-Q., Du Y.-Z., Yuan H., Yu H.-Y.* Core-modified chitosan-based polymeric micelles for controlled release of doxorubicin // *Int. J. Pharm.* 2008. V. 352. P. 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.10.035>
- [11] *Li Q., Du Y.-Z., Yuan H., Zhang X.-G., Miao J., Cui F. D., Hu F.-Q.* Synthesis of lamivudine stearate and antiviral activity of stearic acid-g-chitosan oligosaccharide polymeric micelles delivery system // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010. V. 41. P. 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.08.004>
- [12] *Hu F.-Q., Wu X.-L., Du Y.-Z., You J., Yuan H.* Cellular uptake and cytotoxicity of shell crosslinked stearic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles encapsulating doxorubicin // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008. V. 69. P. 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.09.018>
- [13] *Xiao Y., Li P., Cheng Y., Zhang X., Sheng J., Wang D., Li J., Zhang Q., Zhong C., Cao R., Wang F.* Enhancing the intestinal absorption of low molecular weight chondroitin sulfate by conjugation with α -linolenic acid and the transport mechanism of the conjugates // *Int. J. Pharm.* 2014. V. 465. P. 143–158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.02.009>

- [14] Collins M. N., Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering — A review // *Carbohydr. Polym.* 2013. V. 92. P. 1262–1279. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>
- [15] Mutasher S. H., Salih A. A., Al-Lami H. S. Preparation of some chitosan derivatives and study their effect on human genetic material // *Der Pharma Chemica*. 2016. V. 8. N 11. P. 125–134. <http://derpharmachemica.com/archive.html>
- [16] Sridhari T. R., Dutta P. K. Synthesis and characterization of maleilated chitosan for dye house effluent // *Indian J. Chem. Technol.* 2000. V. 7. P. 198–201.
- [17] Tikhonov V. E., Stepnova E. A., Babak V. G., Krayukhina M. A., Berezin B. B., Yamskov I. A. Amphiphilic N-[2(3)-(dodec-2'-en-1'-yl)succinoyl]-chitosan: Synthesis and properties // *React. & Funct. Polym.* 2008. V. 68. P. 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2007.11.002>
- [18] Lee K. Y., Ha W. Sh., Park W. H. Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. // *Biomaterials*. 1995. V. 16. P. 1211–1216. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)98126-Y](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)98126-Y)
- [19] Neamnark A., Rujiravanit R., Supaphol P. Electrospinning of hexanoyl chitosan // *Carbohydr. Polym.* 2006. V. 66. P. 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.015>
- [20] Чайлахян Р. К., Герасимов Ю. В., Юсупов В. И., Свиридов А. П., Тамбиев А. Х., Воробьева Н. Н., Грошева А. Г., Куралесова А. И., Москвина И. Л., Баграташвили В. Н. Активация мультипотентных стромальных клеток костного мозга лазерным и КВЧ-излучением и их сочетанным воздействием // *Современные технологии в медицине*. 2017. Т. 9. № 1. С. 28–37. <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.1.03>].
- [21] Chaikhalyan R. K., Yusupov V. I., Gorskaya Yu. F., Kuralesova A. I., Gerasimov Yu. V., Sviridov A. P., Tambiev A. Kh., Vorob'eva N. N., Grosheva A. G., Shishkova V. V., Moskvina I. L., Bagratashvili V. N. Effects of acoustic and EHF impulses on multipotent stromal cells during formation of bone marrow containing heterotopic organs in tissue engineered constructions // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015. V. 158. N 5. P. 688–691. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-2836-6>
- [22] Богомолова Т. Б., Козлова Н. В., Чвалун С. Н. Модификация хитозана прививкой гликолевой кислоты с ее последующей поликонденсацией в процессе термообработки // *Высокомолекуляр. соединения*. 2009. Т. 51Б. № 9. С. 1695–1703 [Bogomolova T. S., Kozlova N. V., Chvalun S. N. Modification of chitosan via grafting of glycolic acid followed by polycondensation during heat treatment // *Polym. Sci. Ser. B*. 2009. V. 51. N 9–10. P. 352–359. <https://doi.org/10.1134/S156009040909005X>].