ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ. Серия А, 2022, том 64, № 5, с. 358–367

ПРИРОДНЫЕ ПОЛИМЕРЫ

УДК 541.64:547.995:532(135+77)

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ГИАЛУРОНАНА НА ЕГО ТЕПЛОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ДИНАМИЧЕСКУЮ ВЯЗКОСТЬ ЕГО ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

© 2022 г.
Е. Г. Ли[a], Е. О. Моренко[a], Е. С. Жаворонок[a,*], А. В. Панов[a,b], С. А. Кедик[a,b]

[a] *МИРЭА – Российский технологический университет (РТУ МИРЭА)*
119571 Москва, пр. Вернадского, 86, Россия

[b] *Акционерное общество "Институт фармацевтических технологий"*
121353 Москва, Сколковское ш., д. 21, Россия

**e-mail: zhavoronok_elena@mail.ru*

Поступила в редакцию 05.05.2022 г.
После доработки 21.06.2022 г.
Принята к публикации 05.07.2022 г.

Изучено влияние молекулярной массы гиалуронанов на теплофизические и реовискозиметрические свойства образцов на их основе. Методом ДСК обнаружены экзотермические эффекты, связанные с термодеструкцией этих полисахаридов. Определена связь площади высокотемпературного пика деструкции при 245–248°C и молекулярной массы полимерных гиалуронанов, тогда как для олигомерных гиалуронанов с $M < 6.6 \times 10^3$ этот пик отсутствует. Реовискозиметрические исследования показали, что при низкой концентрации течение водных растворов гиалуронанов близко к ньютоновскому. Установлена связь вязкости раствора с молекулярной массой полимерных гиалуронанов ($M > 50 \times 10^3$) и предложены способы экспресс-оценки молекулярной массы гиалуронана.

DOI: 10.31857/S2308112022700158

ВВЕДЕНИЕ

Гиалуроновая кислота представляет собой природный анионный полисахарид группы глюкозаминогликанов, впервые описанный Мейером и Палмером в 1934 году [1]. Это нетоксичный, биосовместимый и биоразлагаемый мукоадгезивный гликан [2], широко распространенный во внеклеточном матриксе и суставной жидкости млекопитающих, одобренный для инъекций [3]. Следует отметить, что *in vivo* гиалуроновая кислота существует в виде полианиона, а не в форме протонированной кислоты, поэтому ее правильнее называть гиалуронаном [4, 5].

Функции гиалуронана в живых организмах многочисленны и заключаются не только в механической поддержке тканевых структур вследствие уникальных вязкоупругих свойств его растворов, но и в физиологическом действии через взаимодействие со связывающими белками и рецепторами клеточной поверхности [4]. Это открывает широкие перспективы для использования гиалуронана в косметологии, медицине и фармации [4]. В частности, на основе гиалуронана разработаны офтальмологические [6–12], ортопедические [4, 8, 13–15], косметические (дермальные наполнители) [16–18] и др. составы [2, 4, 8]. В настоящее время информация о гиалуронанах вызывает значительный интерес, что отражено в большом числе публикаций и обзорах [4, 8, 9, 18].

Важнейшей характеристикой гиалуронана является его средняя ММ, в значительной мере определяющая биологическое действие этого полимера. Например, гиалуронаны с $M = (0.4–4.0) \times 10^3$ действуют как индукторы белков теплового шока и не имеют свойств апоптоза [19], тогда как гиалуронаны с $M = (6–20) \times 10^3$ обладают иммуностимулирующей, ангиогенной и воспалительной активностями [19]. Гиалуронаны с $M = (20–200) \times 10^3$ принимают участие в процессах эмбрионального развития, заживления ран и овуляции [19]. Напротив, гиалуронаны с очень высокой молекулярной массой ($M > 500 \times 10^3$) отличаются антиангиогенной активностью и могут функционировать как заполнители полостей и естественные иммунологические депрессанты [19]. Таким образом, оценка ММ полимера при его выборе представляет собой первоочередную задачу.

В настоящее время разработан ряд методов для определения ММ гиалуронанов [9], среди которых в качестве основных следует выделить хрома-

тографические, вискозиметрические и электрофоретические.

Для реализации хроматографических методов [7, 20–28] необходимы калибровочные стандарты в достаточно широком диапазоне ММ. Кроме того, при анализе гиалуронанов, например методом ГПХ, необходимо помнить о принципиальном отсутствии колонок, характеризующих высокомолекулярные фракции ($M > 10^7$) [8], т.е. значения M_w высокомолекулярного гиалуронана заведомо не могут быть определены точно.

Вискозиметрические методы [8, 22] основаны на использовании уравнений типа Марка–Куна–Хаувинка. Многочисленные работы показывают, что константы этих уравнений (K и α) зависят от ионной силы и pH [29–37] исследуемых растворов. Помимо этого, как и для большинства полисахаридов логарифмическая зависимость характеристической вязкости от ММ не является линейной в широком диапазоне ММ [22, 38–48]. Так, согласно работе [8] для $M_w < 10^6$ значения K и α составляют 0.029 и 0.80 соответственно, а для $M_w > 10^6$ они равны 0.397 и 0.601 [8]. Авторы работы [49] указывают, что из-за выраженного полиэлектролитного эффекта характеристическую вязкость водных растворов гиалуронанов корректно определить невозможно.

Электрофоретические методы для обнаружения гиалуронанов [8, 38] реализуются, например, на 0.5% агарозном геле в присутствии катионного красителя. В данном случае, однако, также необходимы узко-дисперсные калибровочные образцы [8].

Также для определения ММ гиалуронанов можно применять различные абсолютные методы – седиментацию, статическое светорассеяние [35, 50–52], осмометрию [35, 53, 54], сочетание седиментации и диффузии [32, 35, 55–57]. Тем не менее этим методам в приложении к гиалуронанам тоже присущи определенные ограничения. Так, для реализации метода светорассеяния необходим достаточный градиент показателя преломления по концентрации (dn/dc), причем для растворов гиалуронанов это значение, по данным разных авторов, колеблется в довольно широких пределах от 0.140 до 0.183 [32, 53, 56–59]. Расхождения в значениях dn/dc в основном вызваны наличием примесей в гиалуронанах, ошибками в измерении концентрации и ошибочной калибровкой дифференциальных рефрактометров [8]. Таким образом, корректная оценка ММ гиалуронанов требует большой осторожности и хотя бы приблизительной информации о диапазоне ММ, в который попадает характеристика того или иного образца.

Между тем отдельные источники [60] указывают, что ММ влияет на некоторые термохимические свойства гиалуронанов – например, на характеристики плавления сорбированной этим полисахаридом воды (льда). Интересно, что единственным эффектом на термограммах ДСК, связанным с собственно гиалуронаном, считается высокотемпературный пик (>200°C), объясняемый термической деструкцией этого полисахарида [61]. Однако влияние на положение и свойства данного пика в известной литературе не проанализировано. Другой сравнительно просто определяемой характеристикой гиалуронанов, непосредственно связанной с их ММ, является динамическая вязкость их водных растворов. Судя по результатам, представленным в работах [62–65], между этими характеристиками существует четкая взаимосвязь. В большинстве работ сравнение проводят по значениям максимальной ньютоновской вязкости $\eta(\gamma \to 0)$, поскольку концентрированные растворы гиалуронанов демонстрируют неньютоновское поведение. Растворы гиалуронанов с низкой концентрацией могут проявлять ньютоновский тип течения, что должно облегчить сравнение вязкости растворов гиалуронанов с разными ММ.

Цель настоящей работы – установление влияния ММ гиалуронанов на термическое поведение и вязкостные показатели их низкоконцентрированных растворов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве основных объектов исследования использовали гиалуронаны со среднемассовой $M = (11.2, 20.2, 50, 1300, 1520$ и $1800) \times 10^3$ (по данным производителя “Xi'an Lyphar Biotech Co., Ltd”, Китай). Образцы гиалуронанов представляли собой белые мелкодисперсные порошки с содержанием основного вещества не менее 97.5 мас. %.

Водные растворы гиалуронанов готовили, растворяя навески полисахарида в дистиллированной воде при температуре 23 ± 2°C, постепенно добавляя гиалуронаны в воду и перемешивая систему с помощью смесителя “Vortex 2”. Затем растворы выдерживали при той же температуре не менее 1 ч для избавления от пузырьков воздуха.

Термическое поведение гиалуронанов исследовали методом ДСК на приборе “Netzsch DSK 204 F1” в динамическом режиме при скорости нагревания $w^+ = 10$ град/мин в среде аргона. Измерение динамической вязкости водных растворов гиалуронанов выполняли на ротационном вискозиметре “Brookfield DV2T RV” с рабочим узлом в виде коаксиальных цилиндров, снабженном термостатируемой ячейкой. Эксперимент проводили при скорости сдвига в диапазоне 2–200 c^{-1} при постоянной температуре в интервале от 15 до 50°C для растворов с концентрацией от 6.3×10^{-4} до 5.0 мг/мл.

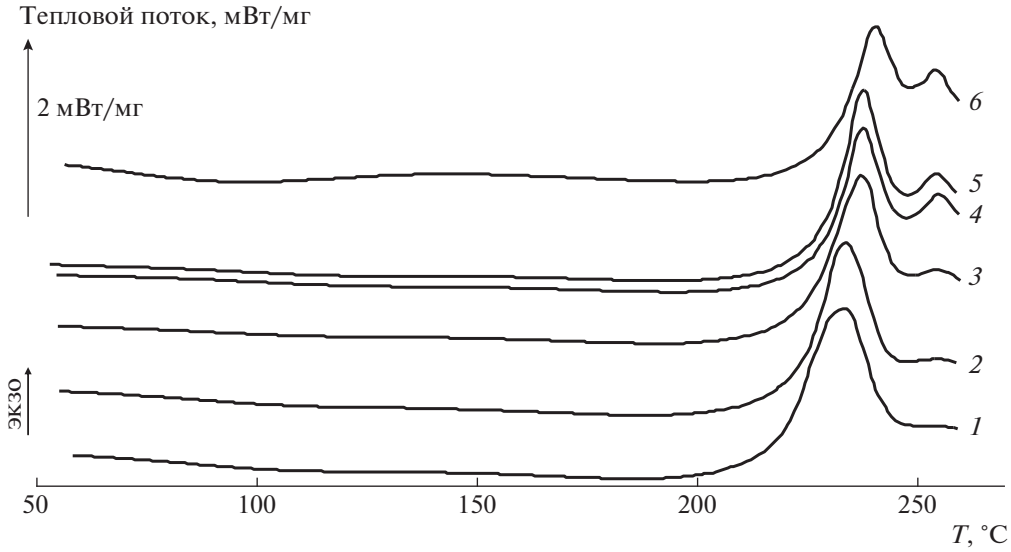

Рис. 1. Термограммы ДСК гиалуронанов с $M = 11.2 \times 10^3$ (*1*), 20.2×10^3 (*2*), 50×10^3 (*3*), 1300×10^3 (*4*), 1520×10^3 (*5*) и 1800×10^3 (*6*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы было проведено исследование термофизических свойств гиалуронанов разной ММ методом ДСК. При первом сканировании образцов на термограммах ДСК в области 20–120°С наблюдались широкие эндотермические пики, связанные с испарением следов воды, после чего образцы охлаждались и проводилось повторное сканирование в диапазоне 20–260°С. Термограммы, полученные в результате второго сканирования, представлены на рис. 1. На них видно отсутствие каких-либо выраженных тепловых эффектов вплоть до 200°С. Выше этой температуры для всех образцов зафиксированы экзотермические эффекты, имеющие вид двух пиков. Для низкомолекулярных образцов (11.2 и 20.2) $\times 10^3$ более высокотемпературный из этих пиков (250–260°С) выражен слабо, тогда как с повышением ММ гиалуронанов его интенсивность заметно возрастает.

В соответствии с работами [61, 66, 67] можно связать обнаруженные экзотермические эффекты с деструкцией гиалуронанов. Обращает на себя внимание правильная форма пиков, которая указывает на преобладание единственного химического процесса при деструкции. Положение максимумов указанных пиков T_{max} по оси температуры несколько сдвигается вправо при повышении ММ (рис. 2). Однако этот сдвиг не превышает 6°С, причем для наиболее высокомолекулярных образцов (1300–1800) $\times 10^3$ значение T_{max} практически постоянно. Таким образом, зависимости T_{max} (ММ) не дают возможность оценивать ММ гиалуронанов с достаточной точностью. Тем не менее отмечено заметное увеличение площади второго экзотермического пика S_2 при повышении ММ (рис. 3), причем эту зависимость можно линеаризовать в полулогарифмических координатах (вставка на рис. 3) и с коэффициентом корреляции 0.99 описать простым уравнением:

$$S_2 = 0.2513 \times \ln M - 0.4742 \qquad (1)$$

Согласно этому уравнению, второй экзотермический пик появляется при $M \geq 6.6 \times 10^3$ (около семнадцати повторяющихся фрагментов), что близко к значению персистентной длины, составляющей двадцать дисахаридных последовательностей [68].

Полученное уравнение позволяет в первом приближении определить диапазон ММ образца гиалуронана для дальнейших его исследований другими методами (например, при выборе хроматографической колонки).

Не менее важную информацию о ММ гиалуронанов может дать реовискозиметрическое исследование их водных растворов. Первоначальное сравнение вязкостных свойств водных растворов гиалуронанов проводилось при их одинаковой концентрации. Отмечено, что для водных растворов гиалуронанов со средней $M = (11.2–1800) \times 10^3$ вязкость изменяется в весьма широком диапазоне, что затрудняет получение сравнительных данных в одной и той же области скорости сдвига. Наиболее приемлемым интервалом концентрации для измерения вязкости следует считать 0.2–5.0 мг/мл, который, согласно работе [69], соответствует вязкости цельной слюны человека (5.0 мг/мл для гиалуронанов с $M = 100 \times 10^3$ и

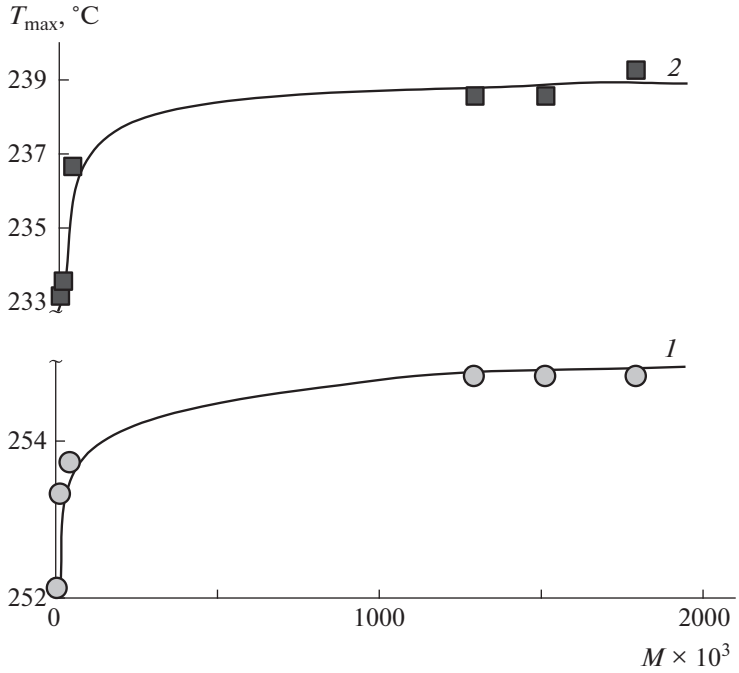

Рис. 2. Зависимость температуры максимума первого (*1*) и второго (*2*) экзотермического пиков на термограммах рис. 1 от ММ гиалуронанов.

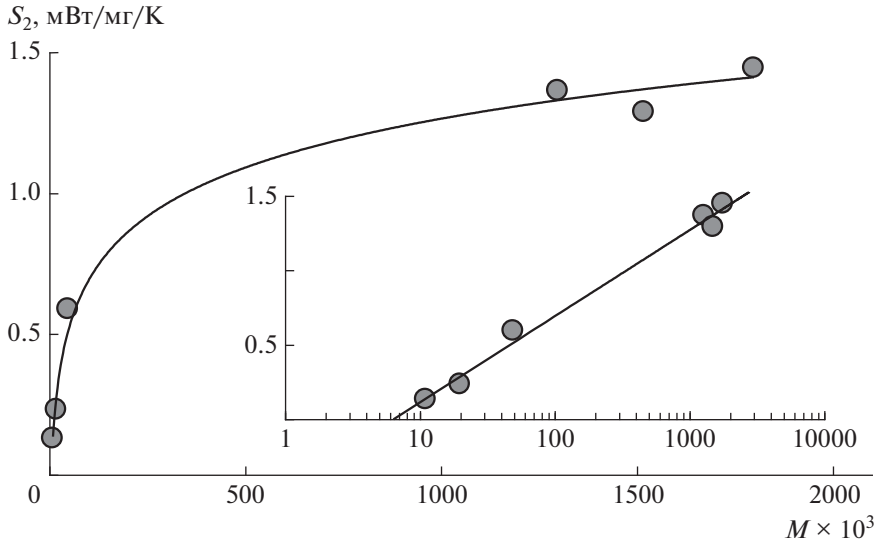

Рис. 3. Зависимость площади второго экзотермического пика на термограммах рис. 1 от ММ гиалуронанов. На вставке представлена полулогарифмическая анаморфоза этой зависимости.

0.2 мг/мл для гиалуронана с $M = 2000 \times 10^3$). В этом диапазоне была выбрана концентрация 5.0 мг/мл, для которой удалось получить кривые течения, представленные на рис. 4.

Все представленные зависимости $\eta(\gamma)$ можно подразделить на два типа. К первому относятся растворы гиалуронанов с низкой $M = (11.2–50) \times 10^3$, проявляющие практически ньютоновское течение в области скорости сдвига 200–260 $с^{-1}$. Второй тип – это высокомолекулярные образцы (1300, 1520 и 1800) $\times 10^3$, которые демонстрируют псевдопластическое поведение при 1–16 $с^{-1}$. Повышение температуры растворов от 15 до 50°C закономерно понижает вязкость, но принципиально не влияет на общий вид кривых течения.

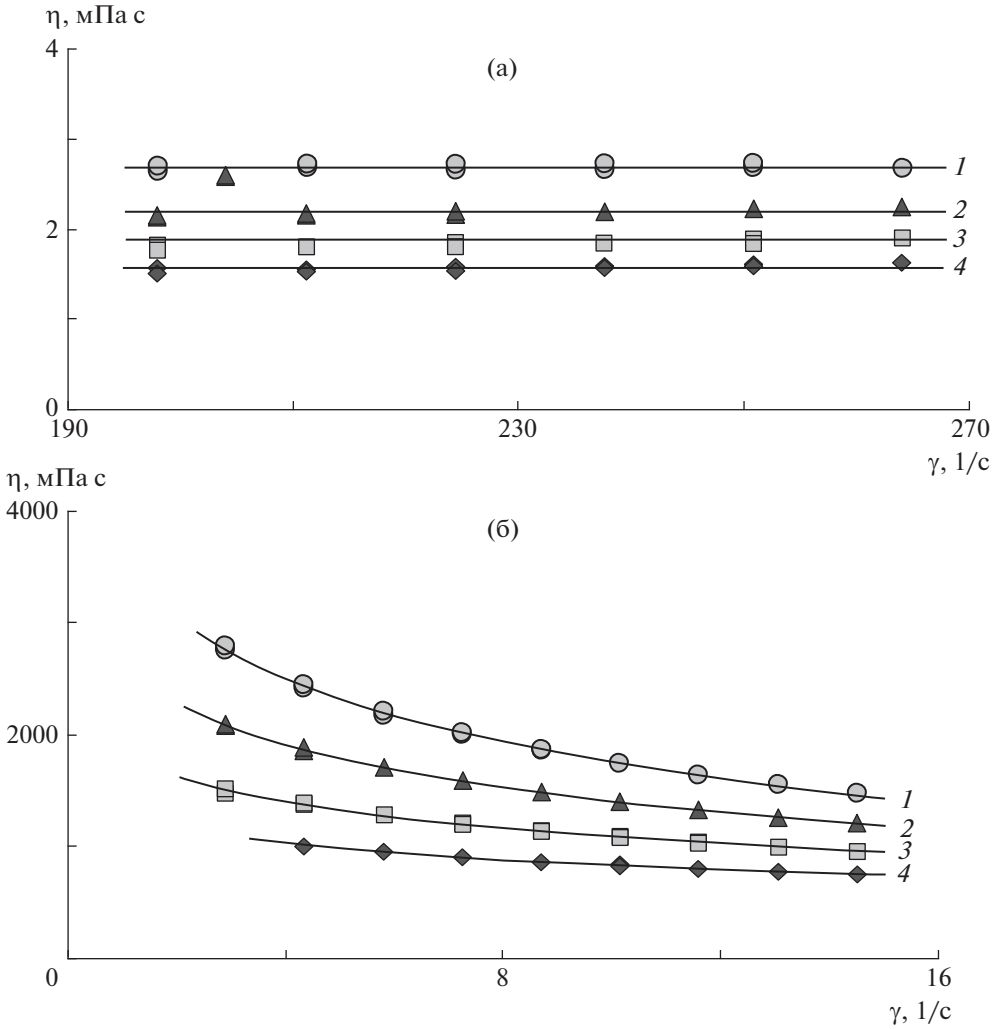

Рис. 4. Типичные кривые течения водных растворов гиалуронанов с концентрацией 5 мг/мл при 15 (*1*), 25 (*2*), 37 (*3*) и 50°C (*4*) и $M = 11.2 \times 10^3$ (а) и 1800×10^3 (б).

Первый тип растворов можно характеризовать величиной ньютоновской вязкости η_N, тогда как второй тип гиалуронанов демонстрирует вязкостно-скоростные кривые, выходящие практически на плато, показывающее вязкость максимально разрушенной в условиях эксперимента структуры раствора. Таким образом, далее для характеристики растворов с псевдопластическим течением была использована η_{eff} при скорости сдвига 12 $с^{-1}$. Тем не менее зависимости η_N и η_{eff} от ММ (рис. 5) удается линеаризовать лишь в логарифмических координатах и только в ограниченной области $M = (50–1800) \times 10^3$.

Для интерпретации полученных результатов пользовались структурной классификацией водных растворов гиалуронанов, предложенной в работе [63] на основании вискозиметрических данных для растворов с концентрацией 10 мг/мл (1 мас. %). Согласно этой классификации, при $M < 350 \times 10^3$ макромолекулы гиалуронанов распределены в растворителе на молекулярном уровне, тогда как свыше этого значения образуется сетка зацепления различной степени “завершенности”. При этом свыше 1600×10^3 образуется “динамически завершенная” сетка зацепления. Очевидно, неньютоновское поведение самых высокомолекулярных образцов в настоящем исследовании связано именно с последним обстоятельством. Следует отметить, что значение “критической” ММ гиалуронанов, при переходе через которую свойства растворов принципиально меняются, имеет достаточно широкий разброс от 37.5×10^3 [9] до 1000×10^3 [8], что зависит от метода исследования, концентрации полисахарида в растворе и используемого набора ММ образцов.

Другим подходом к установлению взаимосвязи вязкостных свойств водных растворов гиалуронанов с их ММ является корреляция между ко-

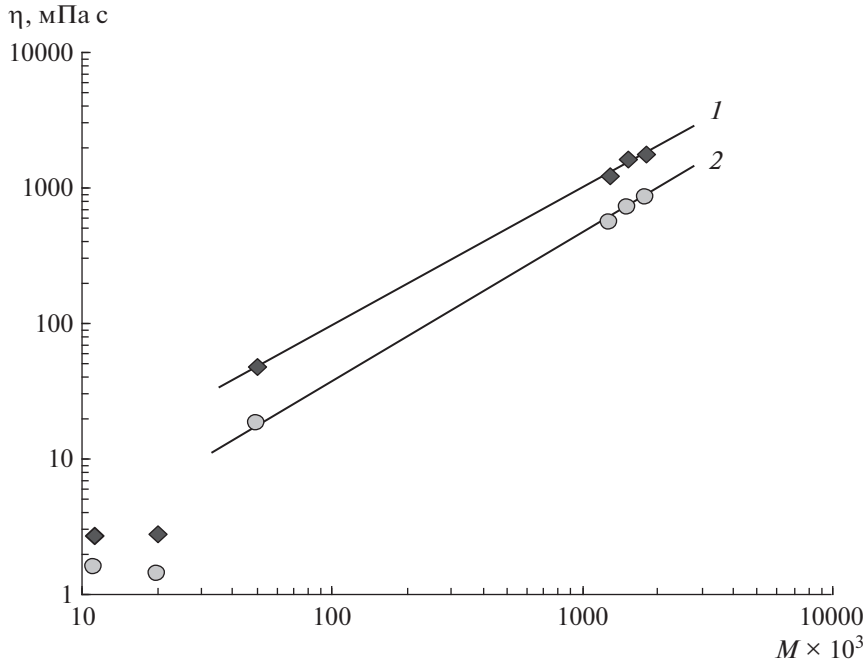

Рис. 5. Зависимость вязкости водных растворов гиалуронанов с концентрацией 5 мг/мл при 15 (*1*) и 50°C (*2*) от их молекулярной массы. Использованы значения эффективной вязкости при 12 $с^{-1}$.

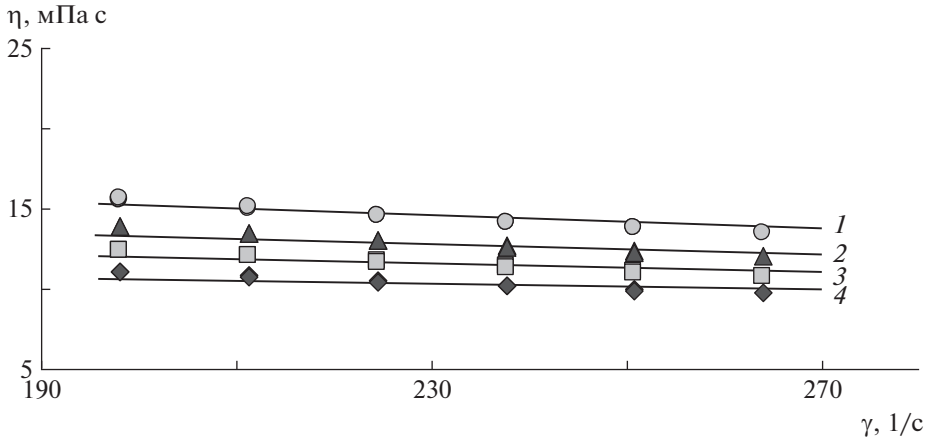

Рис. 6. Типичные кривые течения водных растворов гиалуронанов с $M = 1800 \times 10^3$ и концентрацией 6.25×10^{-4} мг/мл при 15 (*1*), 25 (*2*), 37 (*3*) и 50°C (*4*).

эффициентом вязкости и произведением концентрации гиалуронанов в растворе на его ММ. Авторы работы [64] установили, что при концентрации 10 мг/мл растворы гиалуронанов с $M = (1100–4300) \times 10^3$ демонстрируют неньютоновское течение псевдопластического типа, причем между максимальной ньютоновской вязкостью и произведением ММ имеет место линейная корреляция. Так, были проведены вискозиметрические эксперименты с более низкими значениями концентрации гиалуронанов и получены кривые течения, демонстрирующие близкое к ньютоновскому течение этих растворов (рис. 6). Указанные растворы могут характеризоваться величиной ньютоновской вязкости, зависимости которой от произведения ММ тем не менее также удовлетворительно линеаризуются только при $M > 50 \times 10^3$ (рис. 7).

Таким образом, вискозиметрические эксперименты с растворами гиалуронанов не позволили достоверно связать ММ олигомерных образцов с вязкостью их растворов. Для высокомолекулярных гиалуронанов более точные результаты позволяет получать корреляция, представленная на

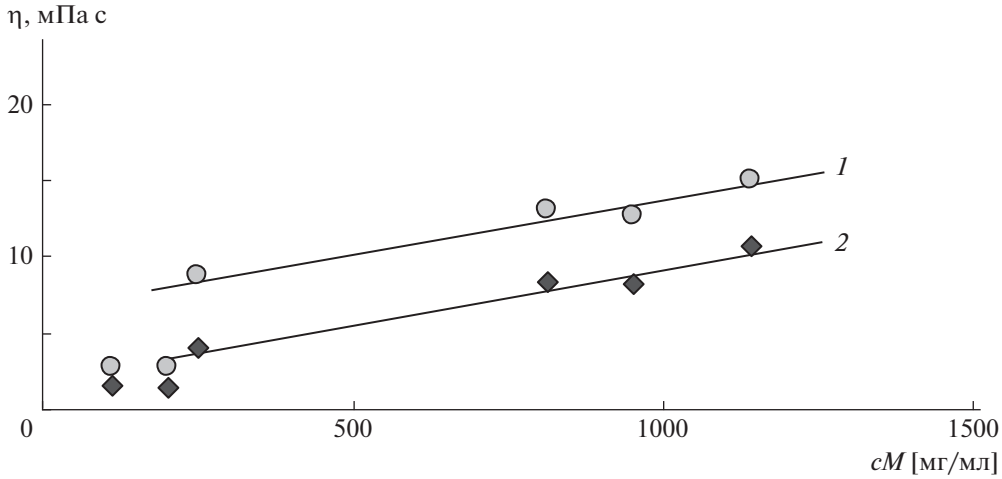

Рис. 7. Зависимость ньютоновской вязкости водных растворов гиалуронанов при 15 (*1*) и 50°C (*2*) от произведения концентрации их растворов на ММ.

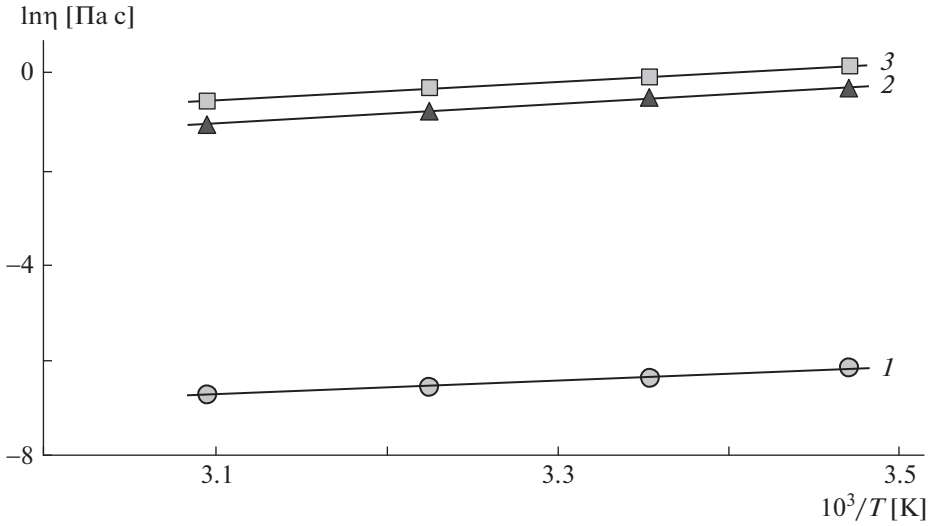

Рис. 8. Температурная зависимость коэффициентов ньютоновской (*1*) и эффективной (*2, 3*) вязкости при 12 $с^{-1}$ для водных растворов гиалуронанов с концентрацией 5 мг/мл на их примере с $M = 11.2 \times 10^3$ (*1*), 1300×10^3 (*2*) и 1800×10^3 (*3*).

рис. 5. Согласно полученным результатам, при постоянной температуре 25°C, наиболее удобной для измерений, связь между вязкостью раствора и ММ описывается уравнением

$$\eta(25°C,\ 5\ мг/мл,\ 12\ с^{-1}) = 0.7792 \times M - 3.3696 \quad (2)$$

Как и формула (1), это выражение пригодно для предварительной оценки ММ образца гиалуронанов, подразумевая последующее установление этой характеристики более точными методами. Важно, что в области низких ММ гиалуронанов (ниже 50×10^3), это уравнение непригодно. Вероятно, это связано с тем, что в силу резкого различия ММ в случае высокомолекулярных гиалуронанов растворы можно классифицировать как концентрированные или полуразбавленные, тогда как для олигомерных гиалуронанов они близки к разбавленным. Кроме того, в рассматриваемых системах не исключен полиэлектролитный эффект. Тем не менее эмпирическое уравнение (2) работает в достаточно широком диапазоне $M = (50–1800) \times 10^3$, и для его использования достаточно измерить вязкость водного раствора гиалуронанов (5 мг/мл, 25°C, 12 $с^{-1}$ для неньютоновских систем) на доступном оборудовании.

Полученные экспериментальные результаты дают возможность дополнительно охарактеризовать закономерности вязкого течения водных растворов гиалуронанов в температурном диапазоне 15–50°C, существенном для их хранения и переработки. Температурные зависимости коэффициентов вязкости, как видно на рис. 8, линей-

Таблица 1. Характеристики вязкого течения водных растворов гиалуронанов с концентрацией 6.25×10^{-4} и 5.0 мг/мл

ММ гиалуронана, кДа	A_η, Мпа с		E_η, кДж/моль	
	при концентрации раствора [мг/мл]			
	6.3×10^{-4}	5.0	6.3×10^{-4}	5.0
11.2	нет данных	41 ± 2*	нет данных	11.2 ± 0.6*
20.2	нет данных	158 ± 8*	нет данных	14.5 ± 0.7*
50	108.1 ± 5.4*	221 ± 11**	16.4 ± 0.8*	22.2 ± 1.1**
1300	4.55 ± 0.23*	2.3 ± 0.1**	10.0 ± 0.5*	19.3 ± 1.0**
1520	4.34 ± 0.22*	1.24 ± 0.06**	9.5 ± 0.5*	18.2 ± 0.9**
1800	1.22 ± 0.06*	0.41 ± 0.02**	6.8 ± 0.3*	15.5 ± 0.8**

Примечание. Рассчитано по температурным зависимостям η_{eff} при *237 и **12 $с^{-1}$.

ны в координатах уравнения Аррениуса–Френкеля–Эйринга [70, 71], что дает возможность оценить температурный коэффициент процесса вязкого течения (табл. 1). Следует отметить, что соответствующие значения довольно низкие и близки к аналогичному показателю для чистой воды [72]. Это означает, что текучесть растворов не сильно улучшается с повышением температуры, что согласуется с представлениями о растворах гиалуронанов как системах с перекрыванием клубков макромолекул. Полученные значения позволяют рассчитывать вязкость водных растворов при различных значениях температуры в диапазоне 15–50°С, причем для гиалуронанов с $M > 50 \times 10^3$ наблюдается тенденция к уменьшению констант уравнения Аррениуса с ростом ММ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На термограммах ДСК образцов гиалуронанов обнаружены высокотемпературные (245–248°С) экзотермические эффекты, связанные с их термодеструкцией. Вискозиметрические исследования показали, что при низкой концентрации (5.0 мг/мл для $M = (11.2–50) \times 10^3$ и 6.3×10^{-4} мг/мл для $M = (1300–1800) \times 10^3$) течение водных растворов гиалуронанов близко к ньютоновскому поведению. Для гиалуронанов с $M > 6.6 \times 10^3$ площадь высокотемпературного пика на термограммах можно связать с ММ. Установлена также взаимосвязь между вязкостью растворов и ММ гиалуронанов в диапазоне $M = (50–1800) \times 10^3$. Обе полученные зависимости дают возможность оценивать ММ образцов гиалуронанов, причем при более низких $M = (11.2–1800) \times 10^3$ точнее оказывается оценка ММ по термограммам, а при более высоких – по вязкости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Meyer K., Palmer J.* // J. Biol. Chem. 1934. V. 107. P. 629.
2. *Kadajji V.G., Betageri G.V.* // Polymers. 2011. V. 3. P. 1972.
3. *Ito T., Iida-Tanaka N., Koyama Y.* // J. Drug Target. 2008. V. 16. P. 276.
4. *Liao Y.-H., Jones S.A., Forbes B., Martin G.P., Brown M.B.* // Drug Delivery. 2005. V. 12. P. 327.
5. *Laurent T.C.* // Acta Otolaryngology (Stockholm). 1987. V. 442. P. 7.
6. *Chen Q., Yin Ch., Ma J., Tu J., Shen Y.* // Pharmaceutics. 2019. V. 11. Art. 183.
7. *Rah M.J.* // Optometry. 2011. V. 82. P. 38.
8. *Lapcik L. jr., Lapcik L., De Smedt S., Demeester J., Chabrecek P.* // Chem. Rev. 1998. V. 98. № 8. P. 2663.
9. *Cowman M.K.* // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 2017. V. 74. P. 1.
10. *Aragona P., Di Stefano G., Ferreri F., Spinella R., Stilo A.* // British J. Ophthalmology. 2002. V. 86. P. 879.
11. *Nepp J., Schauersberger J., Schild G., Jandrasits K., Haslinger-Akramian J., Derbolav A., Wedrich A.* // Biomaterials. 2001. V. 22. P. 3305.
12. *Saettone M.F., Chetoni P., Torracca M.T., Burgalassi S., Giannaccini B.* // Int. J. Pharm. 1989. V. 51. P. 203.
13. *Reeff J., Gaignaux A., Goole J., De Vriese C., Amighi K.* // Drug Development Ind. Pharm. 2013. V. 39. № 11. P. 1731.
14. *Shimojo A.A.M., da Silva Santos Duarte A., Santos Duarte Lana J.F., Luzo A.C.M., Fernandes A.R., Sanchez-*

Lopez E., Barbosa Souto E., Santana M.H.A. // Polymers. 2019. V. 11. Art. 1568.

15. *Shimojo A.A.M., Pires A.M.B., Lichy R., Rodrigues A.A., Santana M.H.A.* // J. Biomed. Mater. Res. A. 2015. V. 103. № 2. P. 730.
16. *La Gatta A., Salzillo R., Catalano C., D'Agostino A., Pirozzi A.V.A., De Rosa M., Schiraldi Ch.* // PLoS One. 2019. V. 14. № 6. Art. e0218287.
17. *Ilyin S.O., Kulichikhin1 V.G., Malkin A.Ya.* // Rheological Acta. 2016. V. 55. P. 223.
18. *Kobayashi T., Chanmee Th., Itano N., Stern R., Asari A.A., Sugahara K.N.* // Biomolecules. 2020. V. 10. Art. 1525.
19. *Stern R., Asari A.A., Sugahara K.N.* // Eur. J. Cell Biol. 2006. V. 85. P. 699.
20. GPC/SEC-MALLS Analysis of Hyaluronic Acid. URL: GPC/SEC–MALLS Analysis of Hyaluronic Acid (Chromatographyonline.com) (01.03.2019).
21. *Alves de Oliveira S., Campos da Silva B., Riegel-Vidotti I.C., Urbano A., de Sousa Faria-Tischera P.C., Tischer C.A.* // Int. J. of Biol. Macromol. 2017. V. 97. P. 642.
22. *Caspersen M.B., Roubroeks J.P., Qun L., Shan H., Fogh J., RuiDong Zh., Tommeraas K.* // Carbohydr. Polym. 2014. V. 107. P. 25.
23. *Barker S.A., Young N.M.* // Carbohydr. Research Res. 1966. V. 2. P. 366.
24. *How M.J., Long V.J.M.* // Clin. Chim. Acta. 1969. V. 23. P. 251.
25. *Caygill J.C.* // Biochim. Biophys. Acta. 1971. V. 244. P. 421.
26. *Chabrecěk P., Sŏlte's B., Ka'llay Z., Novak I.* // Chromatographia. 1990. V. 30. P. 201.
27. *Beaty N.B., Mello R.J.J.* // Chromatographia. 1987. V. 418. P. 187.
28. *Ueno N., Sebag J., Hirokawa H., Chakrabarti B.* // Exp. Eye Res. 1987. V. 44. P. 863.
29. *Fouissac E., Milas M., Rinaudo M., Borsali R.* // Macromolecules. 1992. V. 25. P. 5613.
30. *Hayashi K., Tsutsumi K., Norisuye T., Teramaoto A.* // Polym. J. 1996. V. 28. P. 922.
31. *Fouissac E., Milas M., Rinaudo M.* // Macromolecules. 1993. V. 26. P. 6945.
32. *Schurz J., Hemmetsberger H., Sasshöfer F., Tomiska M., Tritthart H.* // Chemistry. 1967. V. 348. P. 711.
33. *Cleland R.L., Wang J.L.* // Biopolymers. 1970. V. 9. P. 799.
34. *Shimada E., Matsumura G.* // J. Biochem. 1975. V. 78. P. 513.
35. *Cleland R.L., Wang J.L.* // Biopolymers. 1970. V. 9. P. 799.
36. *Mracek A., Benesova K., Minarik A., Urban P., Lapcik L.* // J. Biomed. Mater. Res. A. V. 83. № 1. P. 184.
37. *Balazs E.A., Cowman M.K., Briller S.O.* // Biopolymers. 1983. V. 22. P. 589.
38. *Lee H.G., Cowman M.K.* // Anal. Biochem. 1994. V. 219. P. 78.
39. *Bothner H., Waaler T., Wik O.* // Int. J. Biol. Macromol. 1988. V. 10. P. 287.
40. *Laurent T.C., Ryan M., Pietruszkiewicz A.* // Biochim. Biophys. Acta. 1960. V. 42. P. 476.
41. *Fouissac E., Milas M., Rinaudo M., Borsali R.* // Macromolecules. 1992. V. 25. P. 5613.
42. *Balazs E.A.* // The Amino Sugars: The Chemistry and Biology of Compounds Containing Amino Sugars / Eds. by E.A. Balazs, R.W. Jeanloz. New York: Academic Press, 1965. P. 401. V. 2A.
43. *Shimada E., Matsumura G.* // J. Biochem. 1975. V. 78. P. 513.
44. *Cleland R.L.* // Biopolymers. 1984. V. 23. P. 647.
45. *Turner R.E., Lin P.Y., Cowman M.K.* // Arch. Biochem. Biophys. 1988. V. 265. P. 484.
46. *Bothner H., Waaler T., Wik O.* // Int. J. Biol. Macromol. 1988. V. 10. P. 287.
47. *Mendichi R., Soltés L., Giacometti Schieroni A.* // Biomacromolecules. 2003. V. 4. P. 1805.
48. *Hokputsa S., Jumel K., Alexander C., Harding S.E.* // Carbohydr. Polym. 2003. V. 52. P. 111.
49. *Ribitsch G., Schurz J., Ribitsch V.* // Coll. Polym. Sci. 1980. V. 258. P. 1322.
50. *Ogston A.G., Stainer J.E.* // Biochem. J. 1950. V. 46. P. 364.
51. *Ogston A.G., Stainer J.E.* // Biochem. J. 1951. V. 49. P. 585.
52. *Ogston A.G., Stainer J.E.* // Biochem. J. 1952. V. 52. P. 149.
53. *Blumberg B.S., Oster G.* // Science. 1954. V. 120. P. 432.
54. *Reed C.E., Li X., Reed W.F.* // Biopolymers. 1989. V. 28. P. 1981.
55. *Blumberg B.S., Ogston A.G., Lowther D.A., Rogers H.J.* // Biochem. J. 1958. V. 70. P. 1.
56. *Cleland R.L.* // Biopolymers. 1968. V. 6. P. 1519.
57. *Laurent T.C., Ryan M., Pietruszkiewicz A.* // Biochim. Biophys. Acta. 1960. V. 42. P. 476.
58. *Müller H.-M., Seebach D.A.* // Chem. Int. Ed. Engl. 1993. V. 32. P. 477.
59. *Ghosh S., Li X., Reed C.E., Reed W.F.* // Biopolymers. 1990. V. 30. P. 1101.
60. *Prusova A., Smejkalova D., Chutil M., Velebny V., Kucerik J.* // Carbohydr. Polym. 2010. V. 82. P. 498.
61. *Khachatryan G., Khachatryan K., Grzyb J., Fiedorowicz M.* // Carbohydrase. Polymer. 2016. V. 151. P. 452.
62. *Rebenda D., Vrbka M., Cípek P., Toropitsyn E., Necas D., Pravda M., Hartl M.* // Materials. 2020. V. 13. Art. 2659.
63. *Yanaki T., Yamaguchi T.* // Biopolymers. 1990. V. 30. № 3–4. P. 415.
64. *Bother H., Wik O.* // Acta Oto-Laryngologica (Stockholm). 1987. V. 442. P. 25.

65. *Fouissac E., Milas M., Rinaudo M.* // Macromolecules. 1993. V. 26. P. 6945.

66. *Reeff J., Gaignaux A., Goole J., De Vriese C., Amighi K.* // Drug Development Ind. Pharm. 2013. V. 39. № 11. P. 1731.

67. *Alves de Oliveira S., Campos da Silva B., Riegel-Vidotti I.C., Urbano A., de Sousa Faria-Tischera P.C., Tischer C.A.* // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 97. P. 642.

68. *Trimm H.H., Jennings B.R.* // Biochem. J. 1983. V. 213. P. 671.

69. *Kim J., Chang J.-Y., Kim Y.-Y., Kim M.-J., Kho H.-S.* // Archives Oral Biol. 2018. V. 89. P. 55.

70. *Виноградов Г.В., Малкин А.Я.* Реология полимеров. М.: Химия, 1977.

71. *Malkin A.Y., Isaev A.I.* Rheology: Concepts, Methods, and Applications. Toronto: ChemTec, 2017.

72. *Horne R.A., Courant R.A., Johnson D.S., Margosian F.F.* // J. Phys. Chem. 1965. V. 69. № 11. P. 3988.