КОЛЛОИДНЫЙ ЖУРНАЛ /
COLLOID JOURNAL, 2025, том 87, № 6, с. 701–734

УДК 547.91:47.717
DOI: 10.7868/S3034543X25060094 Обзор / Review

СШИВАЮЩИЕ РЕАГЕНТЫ В НАПРАВЛЕННОМ ДИЗАЙНЕ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

© 2025 г. Н. Р. Кильдеева[1], Ю. О. Привар[2], С. Ю. Братская[2, 3, *]

[1]Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина, ул. Малая Калужская, 1, Москва, 1119071 Россия

[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук, просп. 100-летия Владивостока, 159, Владивосток, 690022 Россия

[3]Дальневосточный федеральный университет, Школа медицины и наук о жизни, о. Русский, п. Аякс, 10, 690922 Россия

**e-mail: sbratska@ich.dvo.ru*

Аннотация. Настоящий обзор систематизирует данные о механизмах и особенностях применения для получения материалов на основе хитозана коммерчески доступных сшивающих реагентов – альдегидов (глутарового альдегида, дженипина, ароматических моноальдегидов) и диглицидиловых эфиров. Показано, что выбор сшивающего агента, способа и условий сшивки (pH, температура, природа кислоты в растворе хитозана) позволяет направленно регулировать морфологию, физико-механические свойства, кинетику набухания и деградации, а также биосовместимость получаемых гидрогелей, пленок и пористых материалов. Развитие стратегий сшивки, в том числе с использованием динамических ковалентных связей и макромолекулярных сшивающих агентов, открывает перспективы для создания инъецируемых, самозалечивающихся и стимул-чувствительных систем для биомедицинского применения. Особое внимание уделено решению проблемы цитотоксичности традиционных сшивающих агентов за счет использования менее токсичных альтернатив (дженипин, диглицидиловые эфиры) и методов, позволяющих снижать степень сшивки без значительного ухудшения механических характеристик материалов.

Ключевые слова: хитозан, сшивка, гидрогели, пленки, криогели

Финансирование работы. Данная работа финансировалась за счет средств бюджета учреждений. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Соблюдение этических стандартов. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных, обзор основан на уже опубликованных данных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.08.2025
После доработки 16.09.2025
Принята к публикации 16.09.2025

© Кильдеева Н.Р., Привар Ю.О., Братская С.Ю., 2025

КОЛЛОИДНЫЙ ЖУРНАЛ /
COLLOID JOURNAL, 2025, vol. 87, no. 6, pp. 701–734

DOI: 10.7868/S3034543X25060094 Обзор / Review

CROSSLINKING AGENTS IN THE TARGETED DESIGN OF CHITOSAN-BASED MATERIALS

N. R. Kildeeva[1], Yu. O. Privar[2], S. Yu. Bratskaya[2, 3, *]

[1]*The Kosygin State University of Russia, Moscow, 119071 Russia*

[2]*Institute of Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia*

[3]*School of Medicine and Life Sciences, Far East Federal University, Ajax Settlement, Russky Island, 690922 Russia*

**e-mail: sbratska@ich.dvo.ru*

Abstract. This review systematizes data on the mechanisms and features of using commercially available crosslinking agents – aldehydes (glutaraldehyde, genipin, aromatic monoaldehydes) and diglycidyl ethers – for the fabrication of chitosan-based materials. It is demonstrated that the choice of crosslinking agent, method, and conditions (pH, temperature, nature of the acid in the chitosan solution) enables a targeted control over the morphology, physicochemical properties, swelling and degradation kinetics, as well as the biocompatibility of the resulting hydrogels, films, and porous materials. The development of crosslinking strategies, including formations of dynamic covalent bonds and usage of macromolecular crosslinking agents, opens prospects for fabrication of injectable, self-healing, and stimulus-responsive systems for biomedical applications. Special attention is given to the cytotoxicity of traditional crosslinking agents through the use of less toxic alternatives (genipin, diglycidyl ethers) and methods that reduce the degree of crosslinking without significantly compromising the mechanical properties of the materials.

Keywords: chitosan, crosslinking, hydrogels, films, cryogels

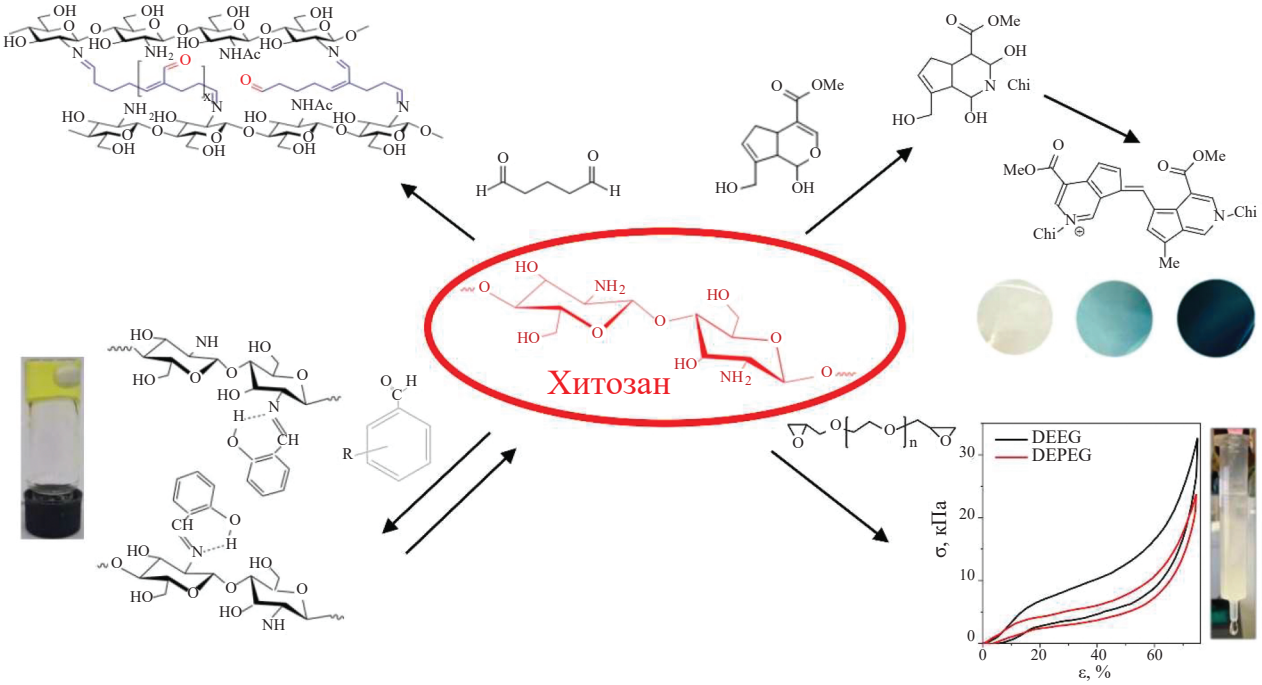
Funding. This work was funded from the budget of the Institutions. No additional grants have been received to conduct or direct this particular study.

Ethics declarations. There are no human or animal studies in this work, the review is based on already published data.

Conflict of interests. The authors declare that they have no conflict of interest.

Received August 20, 2025
Revised September 16, 2025
Accepted September 16, 2025

© Kildeeva N.R., Privar Yu.O., Bratskaya S.Yu., 2025



ВВЕДЕНИЕ

Хитозан – гетерополимер N-ацетилглюкозамина и глюкозамина, соединенных β-(1,4)-гликозидной связью – является единственным полисахаридом катионной природы, что определяет ряд его преимуществ в качестве основы биоразлагаемых функциональных материалов для очистки сточных вод [1], аналитического концентрирования [2], катализа [3, 4], доставки лекарственных средств [5, 6], регенерации тканей [7] и множества других областей применения. Хитозан растворим в водных растворах кислот, обладает даже в немодифицированном виде хорошими комплексообразующими свойствами по отношению ко многим катионам и анионам [8], легко вступает в химические реакции с получением высокозамещенных производных различного типа [9, 10], хорошо формуется в гранулы, пленки, волокна, полые трубки, капсулы и другие формы.

Вместе с тем для достижения необходимых характеристик материалов в большинстве случаев требуется сшивка хитозана, обеспечивающая нерастворимость в широком диапазоне pH, стимул-чувствительность [6, 11, 12], эластичность [13], способность к самозалечиванию [12,14,15].

В результате сшивки изменяется количество свободных аминогрупп, что влияет на биологическую [16, 17] и сорбционную активность хитозана [18], его устойчивость к ферментативной деградации [19, 20]. Особенности строения сшивающего реагента влияют на стабильность, осмотические, механические и многие другие свойства материалов на основе хитозана [23–25]. В связи с этим выбор сшивающего агента становится неотъемлемой частью направленного дизайна материалов с заданными свойствами на основе хитозана [5–7, 26–28].

За счет наличия аминных и гидроксильных групп сшивка хитозана может происходить с образованием ионной или ковалентной связи [29], дополнительная стабилизация надмолекулярной структуры возможна также за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий [30, 31]. Сравнительному анализу влияния ковалентных и ионных сшивок на структуру и свойства гидрогелей хитозана посвящен ряд обзоров [5–7]. В последнее десятилетие для получения материалов на основе хитозана активно применяются стратегии динамической ковалентной химии [32–34], позволяющие за счет сочетания обратимости физически сшитых и механической прочности ковалентно сшитых материалов получать инъецируемые самозалечивающиеся гидрогели [14, 35, 36].

На фоне быстрого расширения способов ковалентной сшивки хитозана за счет фото-инициируемых реакций [37], подходов «клик»-химии – азид–алкинового циклоприсоединения [38], тиол-енового присоединения [39, 40] и реакций Дильса-Альдера [41] – применение большинства из них пока ограничивается научными исследованиями вследствие высокой стоимости реагентов или многостадийного синтеза производных, что может быть оправдано только для ограниченных областей применения, в первую очередь биомедицинских. При этом предметом многолетней дискуссии остается цитотоксичность наиболее распространенных

и коммерчески доступных сшивающих агентов, влияние условий сшивки на структуру и свойства полученных с их применением материалов [13, 42–45]. В связи с этим основной целью данного обзора являлась систематизация информации о механизмах сшивки хитозана с использованием глутарового альдегида (GA), дженипина (Gp), ароматических моноальдегидов, диглицидиловых эфиров (DE) для получения на основе хитозана гидрогелей, пленок и пористых материалов, свойства которых можно направленно настраивать в зависимости от планируемой области применения.

СШИВКА ХИТОЗАНА РЕАГЕНТАМИ С АЛЬДЕГИДНОЙ ГРУППОЙ

Наличие аминогрупп в структуре хитозана обусловливает широкое применение в качестве сшивающих реагентов соединений, реагирующих с хитозаном с образованием оснований Шиффа – GA [46, 47], глицеральдегида (GCA) [42], ацеталей [48], диальдегидов нуклеотидов и нуклеазидов [49], ароматических и гидрофобных алифатических моноальдегидов [12] и макромолекулярных альдегидов – производных полисахаридов, полученных периодатным окислением [36]. Неоспоримыми преимуществами сшивки с образованием оснований Шиффа являются высокая скорость гелеобразования, доступность и достаточно низкая стоимость реагентов, а самыми часто обсуждаемыми недостатками – цитотоксичность при высоких степенях сшивки [44, 45, 50], нерегулярность строения полученных продуктов из-за полимеризации сшивающих реагентов [51–53] или зависимости структуры макромолекулярных альдегидов от условий периодатного окисления [54, 55].

Сшивка хитозана GA

Наиболее распространенные сшивающие реагенты, используемые для сшивки хитозана, это диальдегиды, в первую очередь GA [46, 47], широко применяющийся благодаря низкой стоимости и простоте способа сшивки [47]. Скорость реакции первичных аминогрупп с GA существенно выше, чем с другими алифатическими диальдегидами [56], однако при его применении следует учитывать установленный к настоящему времени факт образования продуктов реакции, содержащих олигомерные цепи GA [57], и потенциальную токсичность [44, 45, 50].

GA может существовать в растворе в виде различных равновесных форм (Схема 1). Повышение pH с 3.0 до 4.2 практически не влияет на состав равновесной смеси, но при pH = 5.6 происходит увеличение содержания линейных форм диальдегида [57]. В щелочной среде (pH 8–13) GA полимеризуется, причем скорость полимеризации увеличивается при повышении концентрации гидроксил-ионов.

Эти процессы определяют вариативный и pH-зависимый механизм реакции взаимодействия хитозана с GA: в составе продуктов реакции в зависимости от условий сшивки и состава реакционной смеси обнаруживают основания Шиффа, а также более длинные сшивки – продукты полимеризации GA [51, 52]. Отмечается, что молекулярная масса (ММ) цепей между двумя последовательными сшивками существенно превышает ММ сшивающего реагента [46]. Предложенный механизм взаимодействия хитозана с GA заключается в образовании альдиминной связи, инициирующей рост олигомерной цепи на хитозане, и последующей межмолекулярной сшивке путем кротоновой конденсации олигомерных цепей модифицированного хитозана [57]. При этом длина олигомерных цепей в модифицированном или сшитом хитозане и количество сопряженных связей N=CHCH=C< и O=CHCH=C< зависят от условий проведения процесса (концентрации GA и pH реакционной среды) [57, 58]. Этот факт необходимо учитывать при создании материалов биомедицинского назначения, так как с ростом числа сопряженных двойных связей увеличивается токсичность сшитого хитозана. Строение продукта взаимодействия хитозана с GA приведено на Схеме 2. Несмотря на указанные недостатки, на сегодняшний день GA остается наиболее часто применяемым ковалентным сшивающим реагентом.

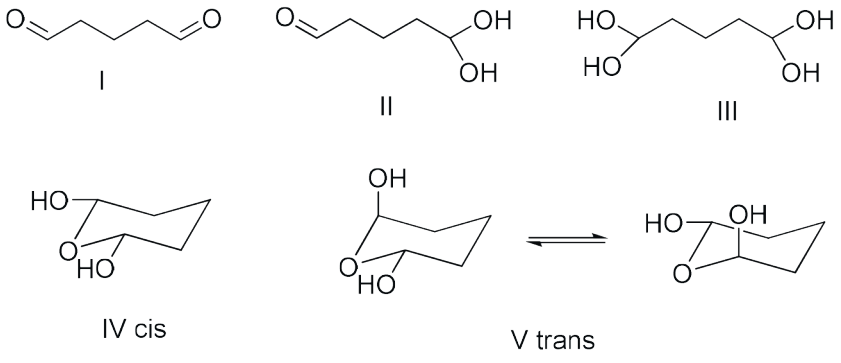


Схема 1. Равновесные формы GA в водных растворах.

Scheme 1. Equilibrium forms of GA in aqueous solutions.

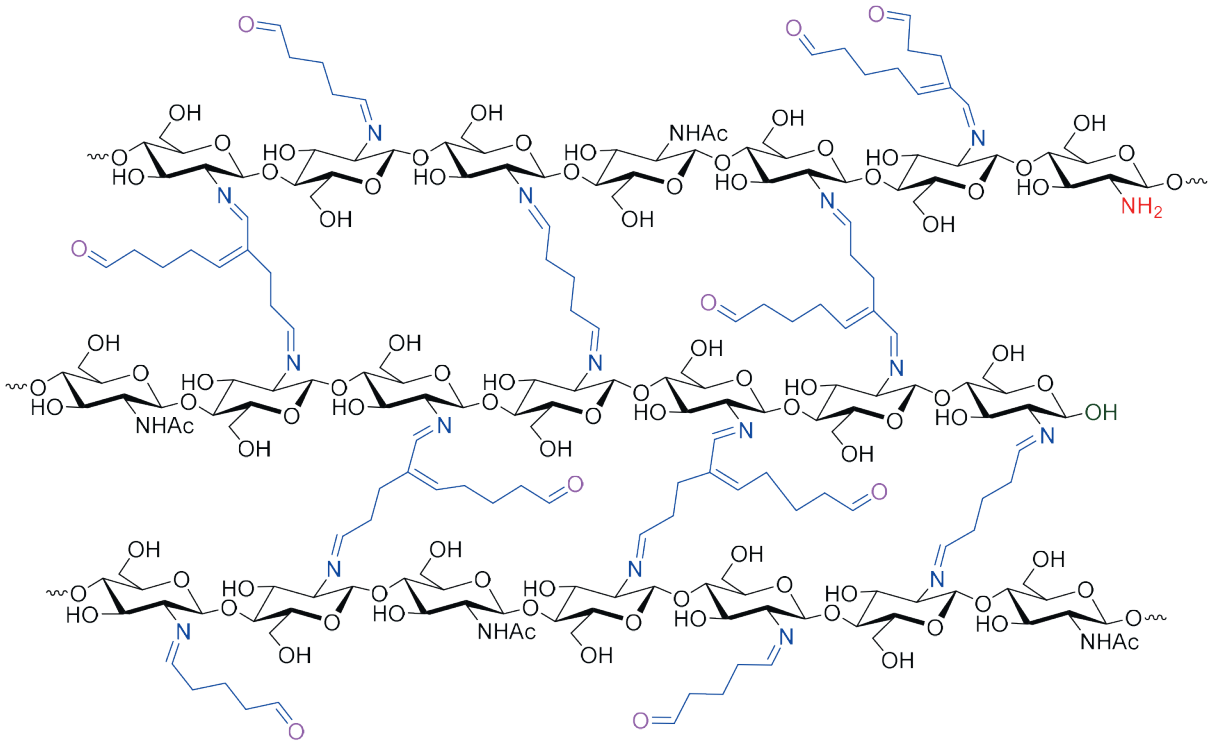


Схема 2. Строение продуктов взаимодействия хитозана и GA.
Scheme 2. Structure of the product of interaction between chitosan and GA.

Вопрос о цитотоксичности GA периодически поднимается в литературе и является стимулом для исследования возможности применения других сшивающих реагентов. Однако следует отметить, что данные о цитотоксичности и биосовместимости материалов в зависимости от условий сшивки, мольного соотношения GA/NH_2, а также характера пористой структуры и формы образцов гидрогелей, существенно отличаются для разных клеточных линий, способ введения в организм и места имплантации (Табл. 1). Тем не менее можно сделать вывод, что благодаря высокой реакционной способности GA возможно снижение мольного соотношения GA/NH_2 до минимальных значений (0.01–0.02 моль/моль), при которых материал не проявляет цитотоксичности. Однако низкая степень сшивки ограничивает возможность варьирования механических свойств матрикса в широком диапазоне [45], что необходимо в клеточных технологиях и регенеративной медицине для имитации микроокружения, свойственного разным типам тканей.

Исследование процесса сшивки хитозана с использованием новых сшивающих реагентов, как правило, проводится в сравнении с GA. Учитывая, что сшивка хитозана в растворе сопровождается ростом вязкости и гелеобразованием, изучается кинетика изменения вязкости и упругих свойств полимерной системы, положение точки гелеобразования, равновесное влагопоглощение и механические свойства гидрогелей, пленок, микросфер или волокон на основе сшитого хитозана.

Сшивка хитозана другими диальдегидами

В работе [42] было изучено гелеобразование в растворах хитозана в присутствии GCA. Показано, что процесс сшивки сопровождается изменением вязкости и гелеобразованием в полуразбавленных растворах хитозана, однако скорость роста вязкости была ниже, чем при использовании GA. Для ускорения процесса сшивки необходимы высокие концентрации GCA, повышение температуры и значение pH, близкое к значению pKa хитозана (pH ≈ 6.3). Сравнительное исследование влияния различных сшивающих агентов на цитотоксичность четырех различных линий клеток показало, что GCA менее цитотоксичен, чем GA и Gp.

Если материал не предназначен для использования в медицине, то в качестве альдегид-содержащих сшивающих реагентов могут быть использованы ортофталевый альдегид [71] или формальдегид [72, 73]. Так, сшитые формальдегидом гидрогели хитозана предложено использовать в качестве абсорбентов с высокой поглощающей способностью [72]. В работе [73] формальдегидом сшивали микросферы хитозана для сорбции ионов меди из водных растворов. Следует отметить, что равновесие реакции с диальдегидами сильно зависит от структуры реагирующих соединений [58].

Таблица 1. Биосовместимость и цитотоксичность матриксов на основе хитозана в зависимости от типа сшивающего реагента (CP) и условий сшивки
Table 1. Biocompatibility and cytotoxicity of chitosan-based matrices depending on the type of crosslinking reagent (CR) and crosslinking conditions

Сшивающий реагент (CP)	Соотношение CP/NH_2	Материал	Клеточная линия/животная модель	Результат	Ссылка
GA	0.282	Гидрогель	Гепатоциты крысы	Сохранение жизнеспособности и функциональной активности клеток на поверхности гидрогеля в течение 5 суток	[59]
GA	0.034, 0.068, 0.1, 0.14, 0.17	Гидрогель	Фибробласты человека	При отношениях GA/NH_2 до 0.1 через 3 суток культивирования на поверхности гидрогеля присутствует 95% жизнеспособных клеток, при GA/NH_2 0.14-0.17 нет адгезии клеток к поверхности, жизнеспособность – менее 10%	[60]
GA	0.17, 0.75, 8.0	Лиофилизованный гидрогель	Клетки остеосаркомы человека MG-63	При отношении GA/NH_2 0.17 – высокая метаболическая активность и пролиферация клеток в течение 7 суток, при более высоких содержаниях GA – отсутствие пролиферации	[45]
GA	0.5-0.83	Лиофилизованные гидрогели хитозана	*Клетки тератокарциномы мыши* ATDC5 и хондроциты суставов быка	Рост клеток преимущественно на внешней поверхности матрикса вследствие ограничения потока питательной среды в поровое пространство. Отсутствие цитотоксического эффекта в течение 14 суток культивирования и гистологически подтвержденное образование коллагена обоими типами клеток	[61]
GA, Gp	0.3	Инъецируемые микросферы	Внутримышечная имплантация мышам	Через 12 недель в случае GA наблюдали воспалительную реакцию, в случае Gp признаки воспаления отсутствовали	[62]
GA, Gp	0.56 и 0.22	Пористый гель (с использованием CO_2)	Фибробласты человека линии GM3348	На 7-е сутки культивирования доля жизнеспособных клеток составляла 100% для GA и Gp	[63]
GA, Gp	0.01	Лиофилизованные гидрогели	Фибробласты мыши линии L929	Через 24 часа инкубирования сохранялась жизнеспособность у 95% клеток (сшивка GA) и 100% при сшивке Gp; в течение 4 суток клетки равномерно распределялись во всех матриксах и пролиферировали.	[64]

Таблица 1. Окончание.

Сшивающий реагент (CP)	Соотношение CP/NH_2	Материал	Клеточная линия/животная модель	Результат	Ссылка
GA, Gp	0.8	Мембраны	Животная модель (имплантация в переднюю камеру глаза кролика)	Через 24 недели имплантаты, сшитые GA, вызывали повышение внутриглазного давления в 1.5 раза и демонстрировали картину воспаления. Мембрана, сшитая GP, способствовала лучшему сохранению плотности эндотелиальных клеток роговицы и обладала более выраженной противовоспалительной активностью по сравнению с несшитым хитозаном.	[65]
GA, Gp	0.3	Мембраны	Фибробласты человека	Качественная оценка: через 3 суток культивирования количество клеток на мембране, сшитой GA и вокруг нее, было меньше, чем на сшитой Gp.	[66]
Gp	0.02, 0.025, 0.033	Криоструктураты	Фибробласты мыши линии L929	Для всех образцов через 24 часа инкубирования снижения количества жизнеспособных клеток не наблюдали	[67]
Нитро-салициловый альдегид	0.25, 0.33, 0.5	Лиофилизованные гидрогели	Клетки HeLa, Животная модель (крыса, подкожная имплантация)	При инкубировании клеток HeLa с гидрогелями доля мертвых клеток составила 60%, в исследованиях *in vivo* установлено незначительное изменение биохимических и иммунологических показателей крови крысы	[68]
DEBD, DEPEG	0.25 (DEBD) 0.083 (DEPEG)	Криогели	Клетки HCT 116	Формирование клеточных сфероидов в порах криогелей, высокая пролиферативная активность в течение 10-14 суток, снижение количества жизнеспособных клеток из-за перенаселенности криогелей	[69]
DEEG	0.25	Криогель	Животная модель (мышь, внутримышечная имплантация)	Через 14 суток умеренная воспалительная реакция вокруг имплантатов сопровождалась формированием нормальной грануляционной ткани. Изменения в печени и селезенке, вызванные низкомолекулярными продуктами деградации имплантата, отсутствовали.	[70]

Для повышения стабильности образующихся связей используют восстановители, как правило, борогидрид натрия $NaBH_4$. И только при сшивке хитозана GA, благодаря особенностям описанного выше механизма реакции, образуются коньюгаты, устойчивые в широком диапазоне pH.

В работах [58, 74, 75] были предложены новые сшивающие реагенты, окисленные нуклеозиды и нуклеотиды, являющиеся по химическому строению производными 3-оксаглутарового альдегида (Схема 3).

Диальдегидные производные компонентов нуклеиновых кислот могут быть легко получены реакцией периодатного окисления. Имеющиеся заместители в 2,4-положениях препятствуют альдольной конденсации и образованию продуктов нерегулярного строения. Наличие фосфатной группировки в молекуле нуклеотида создает условия для реализации не только ковалентных, но и ионных взаимодействий, а также приводит к дополнительной функционализации гидрогеля. Кроме того, сходное строение с GA делает их интересными объектами для изучения влияния структурных особенностей реагентов на процесс сшивки хитозана.

Несмотря на разный механизм сшивки, время гелеобразования в растворе хитозана с ММ 190 кДа и степенью дезацетилирования 86% с oUMP, oAMP и GA было практически одинаковым [74, 75], но короче, чем с oUrd (Рис. 1). Для всех производных скорость гелеобразования уменьшалась с понижением pH [76].

Значительное различие в гелеобразующей способности окисленных производных нуклеозидов и нуклеотидов обусловлено участием фосфатной группы нуклеотида в процессе гелеобразования. На первой стадии происходит образование альдиминных связей, а на второй медленное pH-зависимое отщепление фосфатной группы с образованием сопряженных связей [58]. Структура продукта взаимодействия хитозана с окисленным производным аденозинмонофосфата oAMP приведена на Схеме 4.

Сшивка хитозана Gp: особенности механизма и сравнение с GA

В настоящее время значительное число работ, посвященных получению на основе химически сшитого хитозана полимерных материалов для регенеративной медицины, тканевой инженерии и фармакологии, содержат сведения об эффективности использования

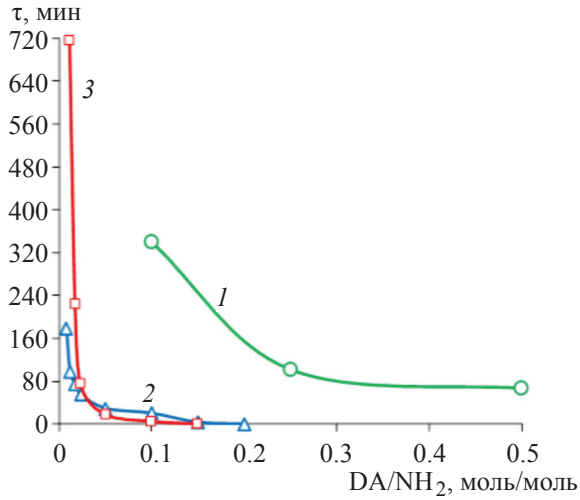


Рис. 1. Влияние соотношения диальдегид (DA)/NH_2-группа на время гелеобразования раствора хитозана (20°C, pH 5.6) в присутствии *1* – oUrd; *2* – oAMP; *3* – GA [75].
Fig. 1. Effect of the dialdehyde (DA)/NH_2 group ratio on the gelation time of chitosan solution (20°C, pH 5.6) in the presence of: *1* – oUrd; *2* – oAMP; *3* – GA [75].

сшивающего реагента природного происхождения дженипина (Gp) [77, 78]. Gp (Схема 5) получают путем ферментативного гидролиза дженипозида. Дженипозид выделяют из плодов двух растений *Genipa Americana* и *Gardenia jasminoides Ellis*. Кроме растительного происхождения, основным достоинством Gp считается низкая цитотоксичность и высокая биосовместимость.

В работах [79, 80] исследован механизм реакции между биополимерами, содержащими первичные аминогруппы, и Gp. Согласно полученным результатам две раздельно протекающие реакции приводят к образованию сшивок между аминогруппами хитозана: более быстрая первая реакция протекает в результате взаимодействия аминогруппы с гидратом Gp, что приводит к формированию гетероциклического соединения Gp, связанного с глюкозаминным остатком хитозана, и вторая стадия, включающая сшивку и олигомеризацию (Схема 5).

Полученные на основе хитозана, сшитого Gp, гидрогели, волокна, пленки имеют выраженную синюю окраску, что свидетельствует о протекании индуцированной кислородом воздуха реакции радикальной

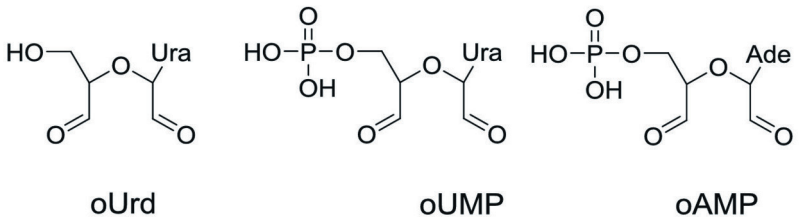


Схема 3. Структуры диальдегидных производных уридина, уридин-5'-фосфата, аденозин-5'-фосфата.
Scheme 3. Structures of dialdehyde derivatives of uridine, uridine-5'-phosphate, and adenosine-5'-phosphate.

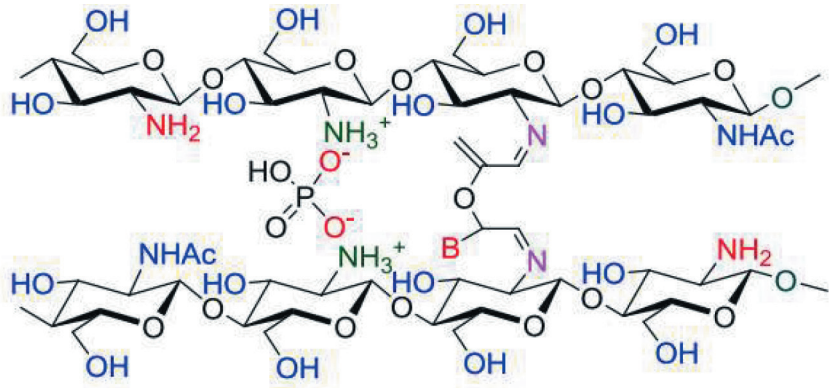


Схема 4. Схематическое изображение продукта взаимодействия хитозана с окисленным производным аденозинмонофосфата oAMP (B = Ade).
Scheme 4. Schematic representation of the product of the interaction of chitosan with an oxidized derivative of adenosine monophosphate oAMP (B = Ade).

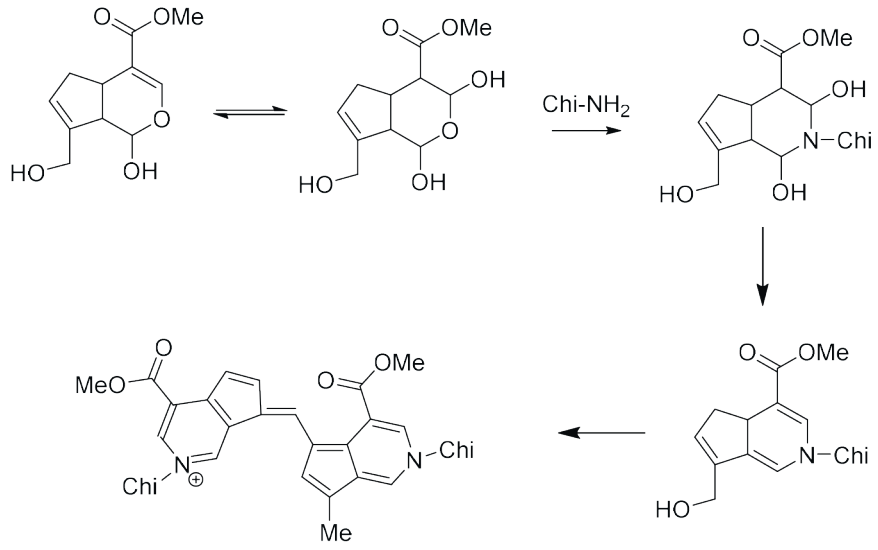


Схема 5. Строение дженипина (Gp) и его гидрата. Механизмы двух реакций Gp с хитозаном (Chi), приводящих к сшивке.
Scheme 5. The structure of genipin (Gp) and its hydrate. Mechanisms of two reactions of Gp with chitosan (Chi) leading to crosslinking.

полимеризации Gp [49, 80]. Таким образом, как и в случае GA, состав продуктов взаимодействия хитозана с Gp может быть непредсказуемым, что определяется соотношением скоростей разных реакций: быстрой и медленной стадий сшивки хитозана и полимеризации Gp с образованием привитых на хитозан олигомерных цепей, также способных участвовать в реакции сшивки [53]. Тем не менее благодаря низкой токсичности и природному происхождению это соединение все чаще используется в качестве сшивающего реагента хитозана при разработке новых материалов для медицины и биотехнологии.

Общие закономерности влияния pH на скорость гелеобразования в растворах хитозана в присутствии диальдегидов

Как уже упоминалось выше, скорость гелеобразования в процессе сшивки хитозана диальдегидами зависит от pH: при уменьшении концентрации ионов водорода растет число депротонированных аминогрупп и реакционная способность в реакциях нуклеофильного присоединения. Растворимость хитозана в водных растворах одноосновных кислот определяется степенью протонирования аминогрупп (pK_a хитозана лежит в интервале 6.2–6.4 в зависимости от содержания остаточных N-ацетильных групп). Так как при pH

выше 6.4 происходит осаждение хитозана, изучение влияния pH на процесс гелеобразования в процессе сшивки возможно лишь в узком диапазоне pH. Но даже при варьировании pH на 1.5–2 единицы наблюдаются драматические изменения в составе продуктов реакции, кинетике сшивки и гелеобразования, реологических и упругих свойствах гидрогелей, физико-механических и осмотических свойствах пленок сшитого хитозана [53, 64, 80–83].

Так, например, повышение pH с 3.8 до 5.6, что соответствует степени протонирования 100% и 82%, привело к значительному ускорению процесса гелеобразования: при мольном соотношении Gp/NH_2 0.02 гель в 2% растворе хитозана с ММ 190 кДа образовался за 15 ч и 3 ч соответственно (Рис. 2) [64]. В растворе хитозана в присутствии GA при pH 5.6 гелеобразование происходило в течение 1 мин, а при pH 4.1 способность к течению исчезала только через несколько часов [76]. Подобную зависимость от pH наблюдали при изучении структурообразования в 2%-ных растворах хитозана с ММ 50, 190 и 320 кДа в присутствии Gp или GA [84, 85], окисленных производных нуклеотидов [76] и глицеральдегида [42]. Вследствие резкого увеличения вязкости раствора с увеличением ММ хитозана время гелеобразования снижается в 2–3 раза в зависимости от природы и концентрации сшивающего реагента [64].

Кинетика изменения вязкости при сшивке Gp, в отличие от GA, характеризуется наличием индукционного периода, продолжительность которого зависит от pH (Рис. 2б). Эта особенность дает возможность завершить подготовительные операции (приготовление композиций, обезвоздушивание, формование и т.п.) для получения более качественных материалов на основе хитозана.

В работе [75] проведена оценка минимального количества сшивающего реагента (GA и оАМР), необходимого для гелеобразования хитозана, которое составило не более 1–2% от общего числа аминогрупп хитозана. Аналогичная оценка с использованием значения равновесной степени набухания по методу Флори-Ренера [83] для пленок хитозана, сшитых Gp, показала, что для получения нерастворимых в воде пленок со степенью набухания около 1000% достаточно 2.7 зацеплений на 100 элементарных звеньев хитозана, что позволяет выбрать состав гелеобразующей композиции для получения материалов с минимальным риском проявления цитоксичности. Вместе с тем при одинаковых мольных соотношениях альдегид/хитозан сшивка Gp обеспечивала более высокую биосовместимость материалов по сравнению со сшивкой GA [43, 65].

Увеличение содержания сшивающего реагента приводит к изменению физико-механических свойств полимерных материалов, росту модуля упругости и снижению равновесной степени набухания пленок и гидрогелей хитозана [84–87], а в случае сшивки Gp к изменению поглощения в разных областях спектра и усилению интенсивности окраски пленок [53, 83] (Рис. 3).

При этом стоит отметить, что при неправильном выборе pH минимальные количества сшивающих реагентов, необходимые для получения гидрогелей хитозана, резко повышаются. Так, в растворе хитозана, приготовленном при двукратном мольном избытке уксусной кислоты, гелеобразование в течение 3 ч происходило только при мольном соотношении $Gp/NH_2 \geqslant 0.16$ и повышении температуры до 37°C, а сшивка GA при комнатной температуре в течение часа проходила при мольном соотношении $GA/NH_2 \geqslant 0.33$ [63].

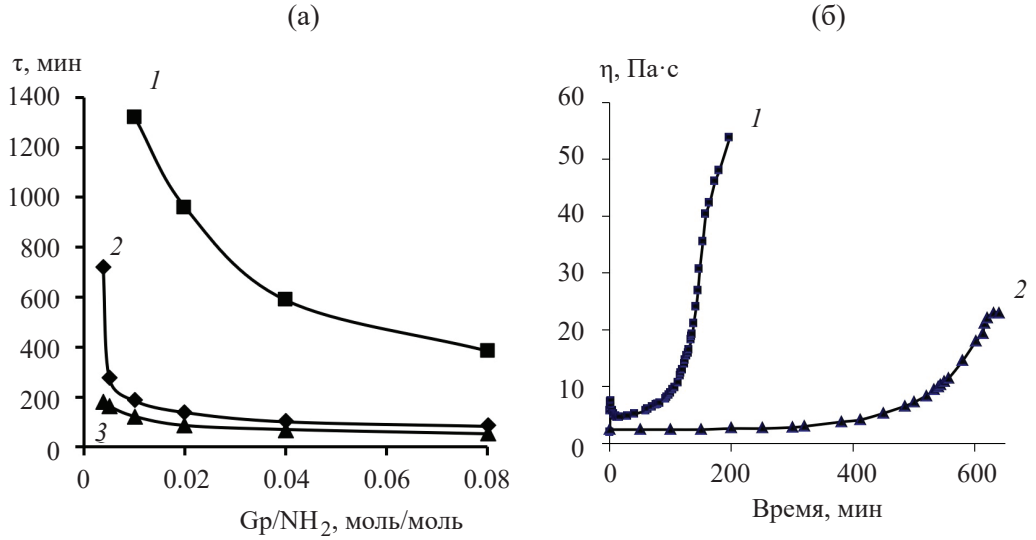


Рис. 2. Влияние pH на время гелеобразования (τ) в растворах хитозана в присутствии Gp. pH: *1* – *3*.8; *2* – 5.6; *3* – 6.4 (а). Кинетика изменения вязкости в 2% растворе хитозана в процессе сшивки Gp при pH 5.6 (*1*) и 3.8 (*2*) (б) [64].
Fig. 2. Effect of pH on the gelation time (τ) in chitosan solutions in the presence of Gp. pH: *1* – 3.8; *2* – 5.6; *3* – 6.4 (a). Kinetics of viscosity changes in a 2% chitosan solution during Gp crosslinking at pH 5.6 (*1*) and 3.8 (*2*) (b) [64].

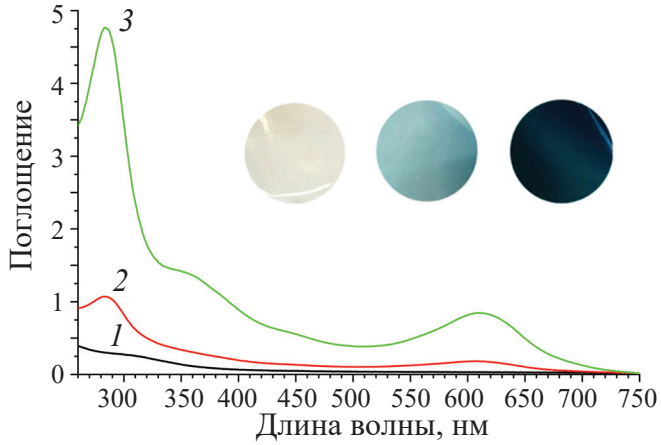


Рис. 3. Электронные спектры поглощения и фотоизображения хитозановой пленки (*1*) и пленок, полученных при мольном соотношении Gp/NH_2 0.003 (*2*) и 0.02 (*3*) [83].
Fig. 3. Electronic absorption spectra and photo images of chitosan film (*1*) and films obtained with a molar Gp/NH_2 ratio of 0.003 (*2*) and 0.02 (*3*) [83].

К большому сожалению, сравнение свойств материалов, полученных разными авторами, часто ограничено отсутствием характеристик хитозана. Так, в ряде работ по культивированию клеток на хитозановых матрицах указана только степень дезацетирования хитозана [45, 59, 60], а в работе [61] указаны очень широкие интервалы как для степени дезацетилирования (75–85%), так и для ММ (50–190 кДа). В большинстве случаев можно говорить лишь об общих закономерностях – времени гелеобразования в зависимости от природы сшивающего реагента и мольного соотношения реагентов, увеличении механической прочности гелей с увеличением концентрации хитозана и сшивающего реагента [61]. Большое значение для понимания особенностей сшивки имеют работы, в которых исследуется широкий ряд экспериментальных условий [45] или сравнивается несколько типов сшивающих реагентов [13, 61–66]. Так, было показано, что при избытке GA увеличивалась жесткость гидрогелей хитозана, но несколько снижалась их прочность, что, вероятно, связано с высокой неоднородностью структуры из-за быстрого гелеобразования [45]. Авторы также отметили, что рост токсичности таких гидрогелей может быть связан с наличием непрореагировавших альдегидных групп фрагментов GA, как показано на Схеме 2.

Ухудшение механических свойств мембран при высоких степенях сшивки с применением как GA, так и Gp отметили также в работе [66]; при этом мембраны, сшитые Gp, разрушались при меньших деформациях, хотя и демонстрировали в ряде случаев более высокие прочностные характеристики и более высокую устойчивость к ферментативной деградации. Более высокая устойчивость к биодеградации микросфер, сшитых Gp, была подтверждена в исследованиях *in vivo,* что, по мнению авторов, определяет их преимущество для пролонгированной доставки лекарств по сравнению с микросферами, сшитыми GA [62]. Сравнительный анализ цитотоксичности и биосовместимости материалов, сшитых GA и Gp, в целом демонстрирует превосходство Gp как сшивающего реагента, особенно при высоких степенях сшивки (Табл. 1).

Сшивка хитозана моноальдегидами с образованием динамической C=N связи

Обратимость иминной связи в основаниях Шиффа с ароматическими альдегидами наряду с другими типами динамических ковалентных связей [15, 88] широко используется в органической химии, в том числе, для получения стимул-чувствительных и самозалечивающихся гидрогелей биомедицинского назначения [32, 33, 89–91]. Способность иминных связей многократно разрываться и восстанавливаться обеспечивает внутримолекулярное перемещение иминного звена вдоль линейной макромолекулы полиамина, служащей молекулярным треком [88], а гидрофобные взаимодействия приводят к формированию стабильных надмолекулярных структур не только при применении диальдегидов, но и моноальдегидов, несмотря на отсутствие в последнем случае межмолекулярных ковалентных сшивок.

Хотя все иминные связи являются обратимыми и разрушаются в кислой среде, наиболее ярко динамическая природа связи в основаниях Шиффа проявляется в случае гидрогелей хитозана, полученных с использованием ароматических и некоторых алифатических гидрофобных моноальдегидов – ванилина [92] и его изомера 5-метоксисалицилового альдегида [93], салицилового [94] и нитросалицилового [68] альдегидов, формилфенилборной кислоты [95, 96], цитраля [97] и коричного альдегида [98]. За счет собственной биологической активности альдегидов и хитозана такие гидрогели и пленки обладают фунгицидными [93, 99], антимикробными [100], противоопухолевыми [68],

антиоксидантными [101] и другими привлекательными свойствами.

Со времени первого сообщения о механизме гелеобразования в растворах хитозана в присутствии ароматических моноальдегидов [102] накоплен значительный объем данных о влиянии природы альдегида и степени сшивки на надмолекулярную структуру гидрогелей хитозана, их механические свойства и чувствительность к внешним стимулам, прежде всего к pH и температуре. За счет динамических связей такие гидрогели способны восстанавливать структуру после ее разрушения [14, 103], эффективно инкапсулировать и высвобождать лекарственные средства [98–100, 104], выполнять роль оптических переключателей [105].

Наиболее заметный вклад в развитие этого направления внесла группа Л. Марин, показавшая, что в ходе динамических процессов иминирования и трансиминирования происходит значительная перестройка сетки водородных связей и самопроизвольная организация иминных фрагментов, принадлежащих различным макромолекулам хитозана, в упорядоченные слоистые надмолекулярные структуры (Рис. 4а, 4г), межплоскостное расстояние в которых коррелирует с длиной образующегося иминного звена. Такие гидрофобные кластеры сохраняют высокую стабильность в водных средах и выполняют функцию узлов нековалентной поперечной сшивки (Рис. 4д), обеспечивая достаточно хорошие механические свойства гидрогелей (Рис. 4б) [12, 104] и пленок [92] (Рис. 4е).

При сохранении общей закономерности уменьшения размера пор с увеличением степени сшивки природа альдегида оказывает значительное влияние на морфологию гидрогелей оснований Шиффа хитозана. Гидрогели с коричным альдегидом отличались наиболее однородной пористой структурой, напоминающей пчелиные соты (Рис. 4и) [12]. Наименьший размер пор (до 26 мкм) имели гидрогели, сшитые гидрофобным цитралем (Рис. 4ж, 4з) [97]. В результате сшивки альдегидами, имеющими OH- группу в орто-положении, получали гидрогели с взаимосвязанной сетью пор с достаточно широким распределением по размеру (Рис. 4в) [12].

В отличие от гидрогелей хитозана, сшитых GA, вследствие высокой обратимости иминной связи в основаниях Шиффа с ароматическими и гидрофобными алифатическими моноальдегидами [92, 102, 106], в кислой и щелочной среде равновесие смещается в сторону исходных веществ (хитозана и альдегида), в результате чего надмолекулярная структура гидрогелей, стабилизированная нековалентными взаимодействиями, разрушается. При этом устойчивость гидрогелей в растворе варьирует от нескольких минут до нескольких месяцев и в значительной степени зависит от гидрофильности и реакционной способности альдегидов, степени сшивки и pH среды.

По сравнению со сшивкой хитозана GA (Рис. 1) [75] для начала гелеобразования требуются значительно более высокие концентрации моноальдегидов. Так, при сшивке хитозана 5-метоксисалициловым и салициловым альдегидом время гелеобразования увеличивалось с нескольких минут при мольном соотношении альдегид/NH_2 1.0 до 7 дней при соотношении 0.17 [93] и 0.4 [104] соответственно. Гелеобразования не наблюдали при соотношении альдегид/NH_2 ниже 0.4 для салицилового альдегида [94, 104], 0.28 для цитраля [97] и 0.13 для нитросалицилового альдегида [68] в 2%-ных растворах хитозанов с ММ 193 кДа [94], 214 кДа [68], 263 кДа [97, 104] и степенью дезацетилирования 82–85%.

Исключительную стабильность гидрогелей, сшитых нитросалициловым альдегидом, на протяжении трех месяцев наблюдения связали со сдвигом равновесия в сторону образования продуктов реакции иминирования за счет образования внутримолекулярной водородной связи между атомом азота и OH-группой альдегида, находящейся в орто-положении (“imine clip” [88]), а также наличия электрон-акцепторного заместителя (нитрогруппы), оказывающего значительное влияние на электрофильность карбонильной группы и устойчивость иминной связи [88]. При этом авторы не исключили вклад в стабильность гидрогелей и низкой растворимости нитросалицилового альдегида в воде [68].

Стабилизирующая роль внутримолекулярной водородной связи хорошо видна на примере гелеобразования хитозана с ванилином [92] и его изомером – 5-метоксисалициловым альдегидом [93], в которых OH-группа находится в пара- и орто- положении соответственно. В случае ванилина в диапазоне мольных соотношений альдегид/NH_2 от 0.2 до 2.0 равновесие в растворе сдвинуто в сторону исходных реагентов (хитозана и ванилина), а степень конверсии составляет 7–12% [92]. В результате получаются очень слабые гидрогели, механические свойства которых повышают путем введения неорганических частиц [107] или использования дополнительных сшивающих агентов, например, триполифосфата натрия [108]. Прочные гидрогели хитозана с ванилином (модуль накоплений >70 кПа) удалось получить только в 5% растворах хитозана при мольных соотношениях альдегид/NH_2 0.66–2.0, но и они полностью растворялись в воде за 15 и 5 ч при температуре 23 и 45°C соответственно, демонстрируя высокую обратимость иминной связи [103]. При той же концентрации сшивающего реагента время гелеобразования в 2% растворе хитозана в присутствии 5-метоксисалицилового альдегида было заметно короче, а потеря массы гидрогеля при pH 5.5 за 48 ч не превышала 10% [93]. Несмотря на то, что гидрогели, сшитые ароматическими моноальдегидами, *in vitro* демонстрировали достаточно высокую цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам [68], в исследованиях *in vivo* они показали достаточно высокую биосовместимость (Табл. 1).

Особенностью реакции хитозана с ароматическими моноальдегидами является также увеличение степени конверсии реагентов в процессе лиофилизации гидрогелей [97] или испарения воды из пленок [92, 109]. Так, в результате испарения воды из пленок хитозана с ванилином степень конверсии повысилась с ~10 до 80% [92], вследствие чего заметно снизилась

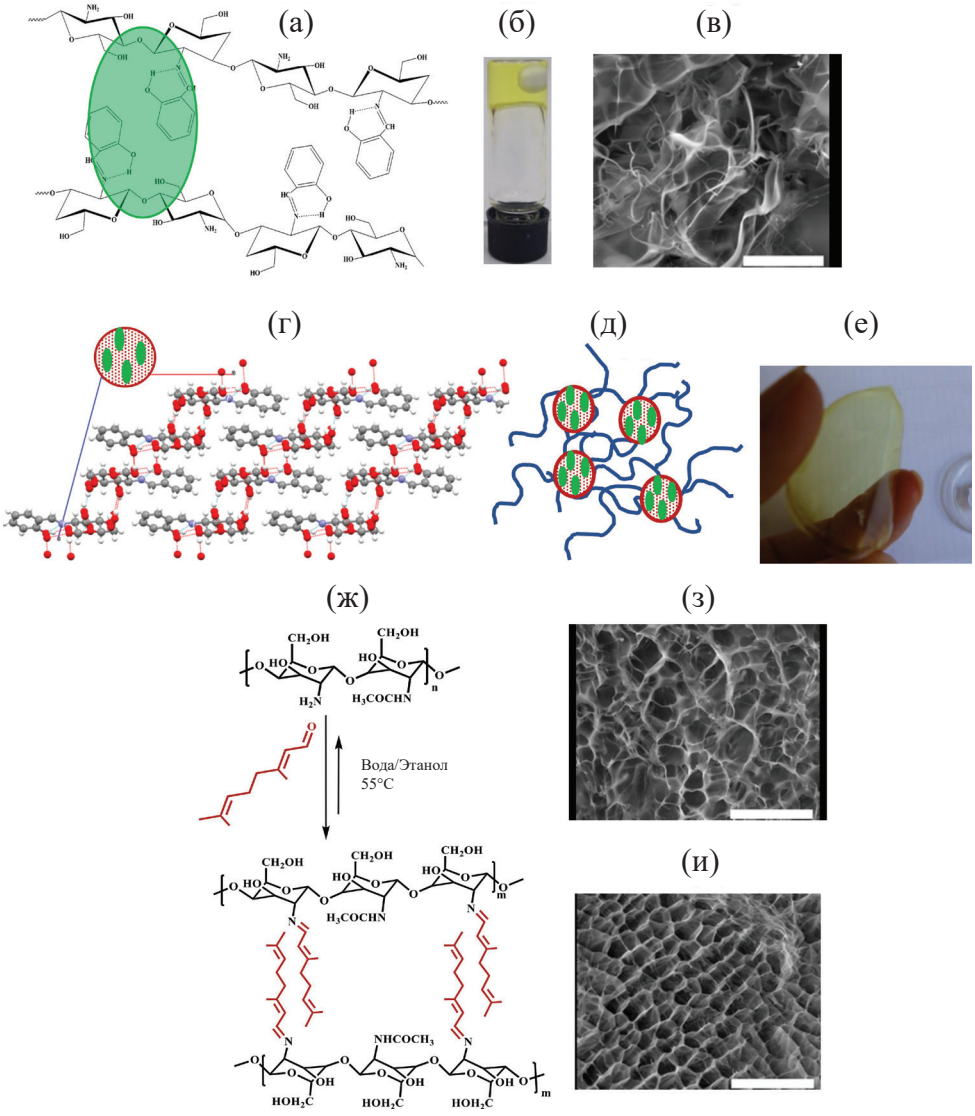


Рис. 4. Структурные фрагменты салицилимина хитозана (а), фотоизображение гидрогеля (б) и СЭМ изображение ксерогеля (в), полученных как описано в работе [104] при мольных соотношениях салициловый альдегид/NH_2 0.5 и 0.4 соответственно. Трехмерная супрамолекулярная архитектура в монокристалле модельного соединения, полученного путем конденсации глюкозамина с салициловым альдегидом (красный – атомы кислорода, белый – атомы водорода, красные линии – водородные связи) – (г) и схематичное изображение надмолекулярной структуры гидрогелей с гидрофобными кластерами – узлами нековалентной поперечной сшивки (д). Фотоизображение пленки хитозана, сшитой ванилином при мольном соотношении ванилин/NH_2 0.2 по методике, описанной в работе [92] (е). Схема получения гидрогеля цитраль/хитозан (ж) и СЭМ изображение ксерогеля с мольным соотношением цитраль/NH_2 0.33 (з) – адаптировано по работе [106]. СЭМ изображение ксерогеля коричный альдегид/хитозан с мольным соотношением альдегид/NH_2 0.5 (и). Масштабная линейка на всех СЭМ изображениях – 50 мкм. Изображения (б–г, е, ж, з, и) предоставлены автором работ [92, 104, 106] – Dr. Habil. Luminita Marin, “Petru Poni” Institute of Macromolecular Chemistry, Iasi, Romania.

Fig. 4. Structural fragments of chitosan salicylimine (a), photo image of hydrogel (b), and SEM image of xerogel (c) obtained as described in [104] at molar ratios of salicylic aldehyde/NH_2 0.5 and 0.4, respectively. Three–dimensional supramolecular architecture in a single crystal of a model compound obtained by condensation of glucosamine with salicylic aldehyde (red – oxygen atoms, white – hydrogen atoms, red lines – hydrogen bonds) (d) and a schematic representation of the supramolecular structure of hydrogels with hydrophobic clusters – nodes of non-covalent crosslinking (e). A photographic image of a chitosan film crosslinked with vanillin at the molar ratio of vanillin/NH_2 is 0.2 according to the procedure described in [92] (f). The scheme for obtaining citral/chitosan hydrogel (g) and SEM-image of a xerogel with a molar ratio of citral/NH_2 0.33 (h) – adapted from [106]. SEM image of a cinnamon aldehyde/chitosan xerogel with a molar aldehyde/NH_2 ratio of 0.5 (i). The scale bar on all SEM images is 50 microns. The images (b–d, f, g, h, i) are provided by the author of [92, 104, 106] – Dr. Habil. Luminita Marin, "Petru Poni" Institute of Macromolecular Chemistry, Iasi, Romania.

скорость их растворения в слабокислой среде. С учетом достаточно быстрого растворения гидрогелей иминов хитозана и высокой зависимости скорости растворения от степени сшивки в узком диапазоне мольных соотношений альдегид/NH_2 [104], лиофилизация или сушка часто используются при получении материалов для пролонгированного высвобождения инкапсулированных лекарственных средств [106, 110] или альдегидов (сшивающих реагентов), обладающих собственной антимикробной активностью [100]. Сместить равновесие в сторону образования продуктов реакции (оснований Шиффа) можно также за счет повышения температуры. С этим свойством связана термочувствительность гидрогелей и их способность к самозалечиванию при температуре > 30°C [104].

Динамическая природа связи в основаниях Шиффа хитозана определяет pH-чувствительность таких материалов и скорость высвобождения альдегидов в раствор в кислой или щелочной среде. Так, для эмульсий «масло-в-воде», стабилизированных конъюгатами хитозана с рядом природных моноальдегидов, было показано, что критическое значение pH, при котором происходит дестабилизация эмульсии, и скорость высвобождения куркумина зависят от структуры альдегида [98]. Эмульсии разрушались при pH 1.0, 3.0, 4.0 и 4.0 в случае коричного альдегида, цитраля, цитронеллаля и ванилина соответственно. А скорость высвобождения куркумина уменьшалась в ряду ванилин > цитронеллаль > цитраль ≈ коричный альдегид. Полученные результаты свидетельствуют о возможности создания эмульсионных систем с программируемым высвобождением активных компонентов путем рационального подбора структуры альдегида в основаниях Шиффа хитозана.

Однако нерастворимость хитозана при физиологических значениях pH несколько ограничивает применение его иминов как стимул-чувствительных средств доставки инкапсулированных лекарственных средств [111]. В связи с чем большой интерес представляют гидрогели с динамической C=N связью на основе водорастворимых производных хитозана [35, 112–116]. Такие гидрогели чаще получают на основе карбоксиалкилхитозанов и гликоль-хитозанов с применением бифункциональных реагентов с концевыми бензальдегидными группами [35, 115]. Проведение реакции между водорастворимыми производными хитозана и ароматическими моноальдегидами в слабощелочной или нейтральной среде позволяет получать более стабильные гидрогели при более низких концентрациях альдегида, чем в растворах хитозана [112, 117] за счет максимальной стабильности C=N связи при pH ~7 [115]. Так, в диапазоне pH 4–8 потеря массы гидрогелей N-карбоксиэтилхитозана (КЭХ) с ванилином, полученных при мольных соотношениях альдегид/мономерное звено КЭХ 0.4 и 0.2, не превышала 20% в течение 24 ч при температуре 25°C [117], тогда как гидрогели хитозана с мольным соотношением 0.5 полностью растворялись за 15 ч [64]. Гелеобразование в растворах карбоксиалкилхитозанов в присутствии салицилового альдегида наблюдалось при его концентрации в несколько раз ниже, чем в растворе хитозана, а гидрогели салицилиминов КЭХ были более прочными, чем гидрогели N, O-карбоксиметилхитозана (КМХ) при тех же соотношениях альдегид/мономерное звено [112].

При pH, близком к физиологическому значению, контролировать скорость растворения гидрогелей салицилиминов хитозана можно путем добавления аминокислот, конкурирующих с производными хитозана в реакции трансиминирования. В результате образования более устойчивых оснований Шиффа между лизином и салициловым альдегидом наблюдали полное растворение гидрогеля салицилимина КЭХ в течение 24 ч при концентрации аминокислоты 20 г/л [112]. Чувствительность салицилиминов КЭХ к присутствию аминокислот сохранялась и при сшивке КЭХ бифункциональным реагентом – метилен-бис-салициловым альдегидом (МБСА) (Рис. 5а, 5б) [114]. Кинетика изменения массы гидрогелей КЭХ, сшитых МБСА, существенно зависела от плотности сшивки в среде для культивирования клеток DMEM с суммарным содержанием аминокислот 1.68 ммоль/л, при этом в фосфатно-солевом буфере масса оставалась неизменной на протяжении всего периода наблюдений (более 10 суток). Слабо сшитые МБСА гидрогели с мольным соотношением альдегид/мономерное звено 0.02 очень быстро набухали и полностью растворялись в среде DMEM в течение 28 ч, гидрогели с более высокой плотностью сшивки (альдегид/мономерное звено 0.1) медленно набухали и полностью растворялись за 11 дней (Рис. 5б), демонстрируя значительно более низкую цитотоксичность по сравнению с гидрогелями, сшитыми салициловым альдегидом (Рис. 5в) [114], что позволяет использовать их для пролонгированного высвобождения лекарственных средств и инкапсулирования клеток.

Сшивка хитозана с применением макромолекулярных и олигомерных сшивающих реагентов с альдегидной группой

Хрупкость – один из существенных недостатков материалов на основе хитозана. Помимо добавления пластификаторов (глицерина, органических кислот и др.), эффективным способом повышения эластичности полимерных материалов является использование гибкоцепных олигомерных и макромолекулярных сшивающих реагентов. В случае хитозана введение ПЭГ и других макромеров, как правило, осуществляется через концевые альдегидные группы [13, 118, 119]. Это позволяет получать инъецируемые гидрогели, а после лиофилизации эластичные пористые матрицы, но из-за токсичности альдегидов полученные гидрогели требуется очищать диализом [118, 119].

В качестве макромолекулярных сшивающих агентов используются и производные полисахаридов (декстрана, альгиновой кислоты, хитозана), в структуре которых в результате периодатного окисления присутствуют альдегидные группы [61, 77]. Существенным недостатком такого подхода является зависимость структуры макромолекулярных альдегидов от условий периодатного

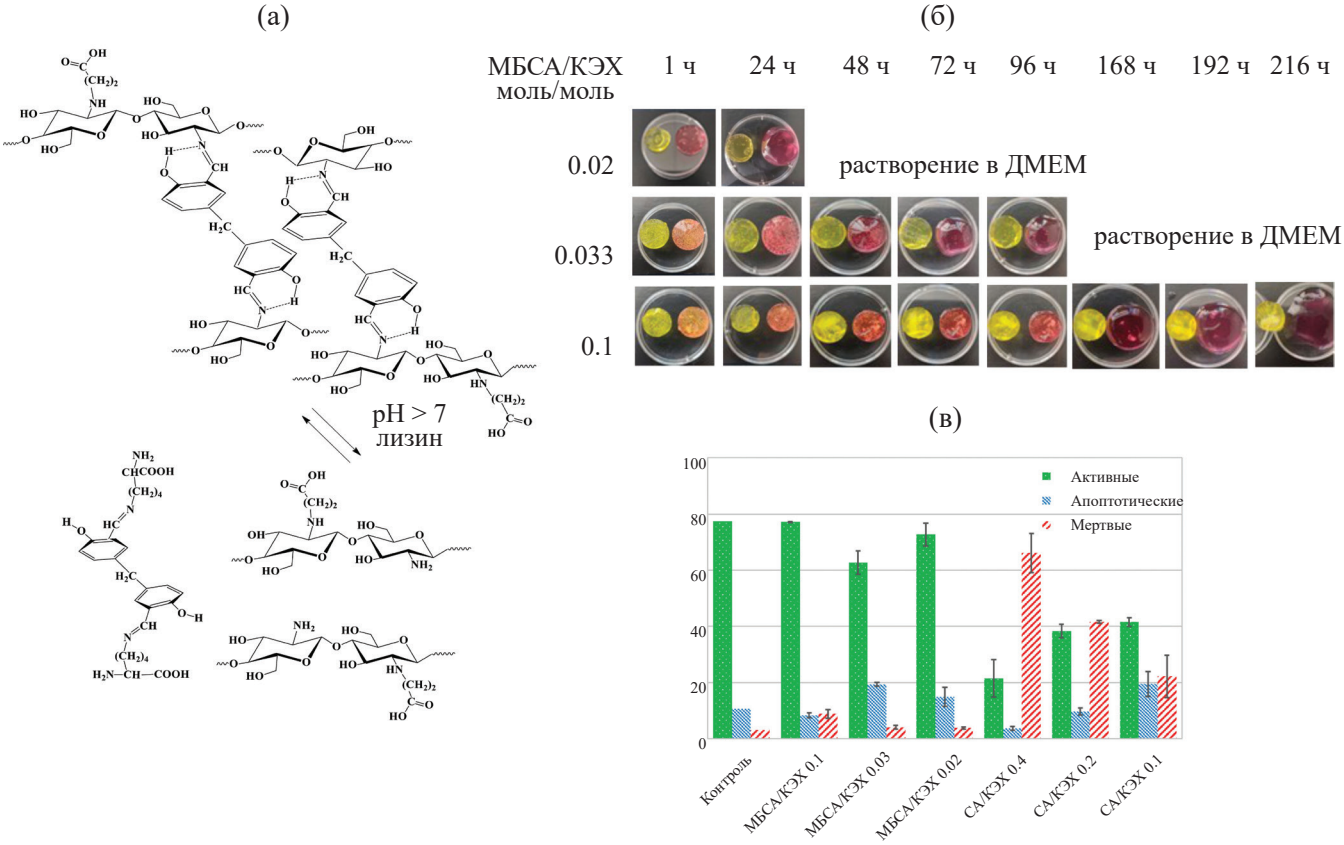


Рис. 5. Схема стимул-индуцированного растворения гидрогелей КЭХ, сшитых МБСА, в присутствии лизина (а). Набухание и растворение гидрогелей КЭХ в зависимости от степени сшивки в фосфатно-солевом буферном растворе и среде DMEM, $T = 37°C$: в каждом кадре приведены изображения исходного гидрогеля (слева) и набухшего в DMEM (справа) (б). Результаты проточного цитометрического анализа первичных фибробластов кожи человека (HDF), культивированных в гидрогелях в течение 24 ч (в). Адаптировано по работе [114].
Fig. 5. Scheme of stimulus-induced dissolution of CEC hydrogels crosslinked with MBSA in the presence of lysine (a). Swelling and dissolution of CEC hydrogels depending on the degree of crosslinking in phosphate-salt buffer solution and DMEM medium, $T = 37°C$: images of the initial hydrogel (left) and swollen in DMEM are shown in each frame. (right) (b). Results of flow cytometric analysis of primary human skin fibroblasts (HDF) cultured in hydrogels for 24 h (c). Adapted from [114].

оксисления [54, 55]. В настоящем обзоре этот вопрос подробно не рассматривается, так как представляет собой отдельную тему и относится к области полимер-полимерных взаимодействий. Вместе с тем можно отметить, что сравнительные исследования механических свойств гидрогелей кватернизованного хитозана, сшитых GA, окисленным декстраном и блок-сополимером ПЭГ и полиэфира ксилитола и себациновой кислоты с концевыми бензальдегидными группами, показали значительное преимущество последнего сшивающего реагента [13]. Удельная потенциальная энергия деформации гидрогеля, сшитого GA, была в 3–9 раз ниже по сравнению с другими гидрогелями, а разрушение его структуры наблюдалось при минимальном в ряду уровне деформации (~40%) и напряжении менее 10 кПа. Вместе с тем при сравнении свойств лиофилизованных гидрогелей хитозана, сшитых GA и окисленным декстраном, более высокие прочностные характеристики и преимущества в качестве матриксов для культивирования клеток были отмечены для материалов, сшитых GA (Табл. 1) [61].

СШИВКА ХИТОЗАНА ДИГЛИЦИДИЛОВЫМИ ЭФИРАМИ

По сравнению со сшивающими реагентами, имеющими концевые альдегидные группы, более перспективными для биомедицинского применения являются диглицидиловые эфиры (DE). Например, диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола (DEBD) используют в качестве сшивающего реагента в большинстве филлеров на основе гиалуроновой кислоты. Стабильность и безопасность материалов, сшитых DEBD, делают его промышленным стандартом в косметологии [120]. Также DE используют для консервации биологических тканей и стабилизации тканеинженерных конструкций, использующихся в качестве имплантатов [121]. Хотя методика фиксации тканевых клапанов биопротезов GA

применяется уже около 30 лет, считается, что решение имеющихся проблем кальцификации и иммуномодулированного воспаления может быть достигнуто только путем разработки альтернативных методов фиксации без использования GA [122].

Вследствие того, что DE реакционноспособны преимущественно при pH > 10 [123, 124], а хитозан нерастворим в щелочных средах, этот тип сшивки до недавнего времени практически не использовался для хитозана и применялся в основном для получения гидрогелей производных хитозана, растворимых в широком диапазоне pH, таких как карбоксиметилхитозан (КМХ) [125] и гликоль-хитозан [126]. При сшивке в изопропаноле пленок хитозана, сформированных осаждением в щелочном растворе, при пятикратном мольном избытке DEBD по отношению к аминогруппам хитозана степень модификации хитозана сшивающим реагентом составила не более 25–35% [19]. Ограниченные примеры реакций DE с хитозаном в кислых средах включали отверждение при +160–200°C покрытий на основе диглицидилового эфира бисфенола А хитозаном из уксуснокислого раствора [127]; сшивку гидрогелевых пленок из растворов хитозана в 0.4% и 2% уксусной кислоте с использованием диглицидилового эфира полиэтиленгликоля (DEPEG) при +80°C [128]; изготовление нановолоконных гидрогелевых мембран путем формования из растворов хитозан/ПВА в муравьиной кислоте, содержащих диглицидиловый эфир этиленгликоля (DEEG) в качестве сшивающего реагента с последующим завершением реакции сшивки при +60°C [129].

Поскольку принципиальная возможность протекания реакции между эпоксидами и аминами не вызывает сомнений [130], отсутствие сшивки хитозана DEPEG в 2% растворе уксусной кислоты даже при большом мольном избытке сшивающего реагента [128] можно в первую очередь связать с тем, что полностью протонированная при избытке кислоты аминогруппа хитозана неактивна в реакции нуклеофильного замещения. В то же время ацетат-ион в уксуснокислых растворах является нуклеофилом и может конкурировать с хитозаном в реакциях с DE, что, видимо, не принималось во внимание большинством авторов с учетом высокой эффективности сшивки хитозана реагентами с альдегидной группой в уксуснокислых растворах и низкой в солянокислых [48].

Помимо целевой реакции сшивки (Рис. 6а, реакции 1 и 2), в уксуснокислых растворах хитозана DE могут расходоваться на следующие побочные реакции – этерификацию уксусной кислоты (реакция 6), прививку сшивающего реагента в боковую цепь без образования сшивки (реакция 3) с возможной последующей деактивацией эпоксидной группы при взаимодействии с водой или ацетат-ионом (реакции 4 и 5).

Действительно, при сшивке хитозана DEEG в солянокислом растворе при pH 5.0 модуль накопления гидрогеля через 24 ч был в 5.9 раз выше, чем в уксуснокислом при том же значении pH [131]. В ИК-спектре реакционной смеси хитозан/DEPEG уже через час после добавления сшивающего реагента идентифицировалась полоса поглощения при 1735 $см^{-1}$, соответствующая сложному эфиру (Рис. 6б), аналогичные изменения наблюдались и в присутствии других DE. При этом интенсивность полосы поглощения сложного эфира увеличивалась со временем вместе с повышением модуля накопления гидрогелей (Рис. 6в), подтверждая, что побочная реакция этерификации идет параллельно с целевой реакцией сшивки. Резкое падение интенсивности полосы при 1735 $см^{-1}$ после удаления растворимых продуктов реакции (спектр *2* в AcOH, Рис.6б) свидетельствует о преимущественном прохождении побочной реакции этерификации без участия хитозана (Рис. 6а, реакция 6). В то же время наличие небольшого плеча в этой области спектра (Рис. 6б) не исключает этерификацию концевой эпоксидной группы привитого к хитозану фрагмента DE (Рис. 6а, реакция 5). Несмотря на то, что целевая реакция сшивки может теоретически осуществляться как по OH-группам, так и по аминогруппам хитозана, скорость гелеобразования резко увеличивалась при pH >4.5 (Рис. 6г), а время гелеобразования сокращалось почти в 10 раз в узком диапазоне pH от 5.0 до 5.5 [70,131], что говорит о преимущественной сшивке по аминогруппам, степень протонирования которых уменьшается в этом интервале pH, повышая вероятность их участия в реакциях нуклеофильного замещения.

Хотя из литературных данных известно, что уксусная кислота является более эффективным катализатором реакций аминов с DE, чем соляная [132], в системе хитозан/DE более низкая реакционная способность хитозана по сравнению с низкомолекулярными аминами приводит к тому, что значительное количество DE расходуется на побочную реакцию с уксусной кислотой быстрее, чем происходит сшивка. При этом длина цепи DE влияет на вероятность прохождения реакций сшивки или расхода сшивающего реагента на побочные реакции [131]. Более резкое падение эффективности DEEG по сравнению с DEPEG в уксуснокислом растворе связано с его более высокой реакционной способностью, приводящей к быстрому расходу реагента на побочные реакции. Таким образом, в отличие от сшивки большинством других сшивающих агентов, сшивку хитозана DE нежелательно проводить в уксуснокислых растворах и, вероятно, в растворах других карбоновых кислот, взаимодействующих с DE. В оптимальных условиях (солянокислый раствор, pH 5.0–5.5) гидрогели хитозана, сшитые DE, при комнатной температуре можно получить почти при таких же низких мольных соотношениях, как и с GA, но гелеобразование в данном случае протекает значительно медленнее: при эквимолярном соотношении реагентов в 3% солянокислом растворе хитозана с ММ 30 кДа и степенью дезацетилирования 90% при pH 5.5 гель образовывался за 1 ч и 2 ч в случае DEEG и DEPEG соответственно, а при отношении DE/NH_2 0.05 время гелеобразования было более 37 ч [133].

Существенным преимуществом DE по сравнению с диальдегидами, в том числе применяющимися для введения блок-сополимеров полиэфиров с целью повышения эластичности гидрогелей хитозана [13], является

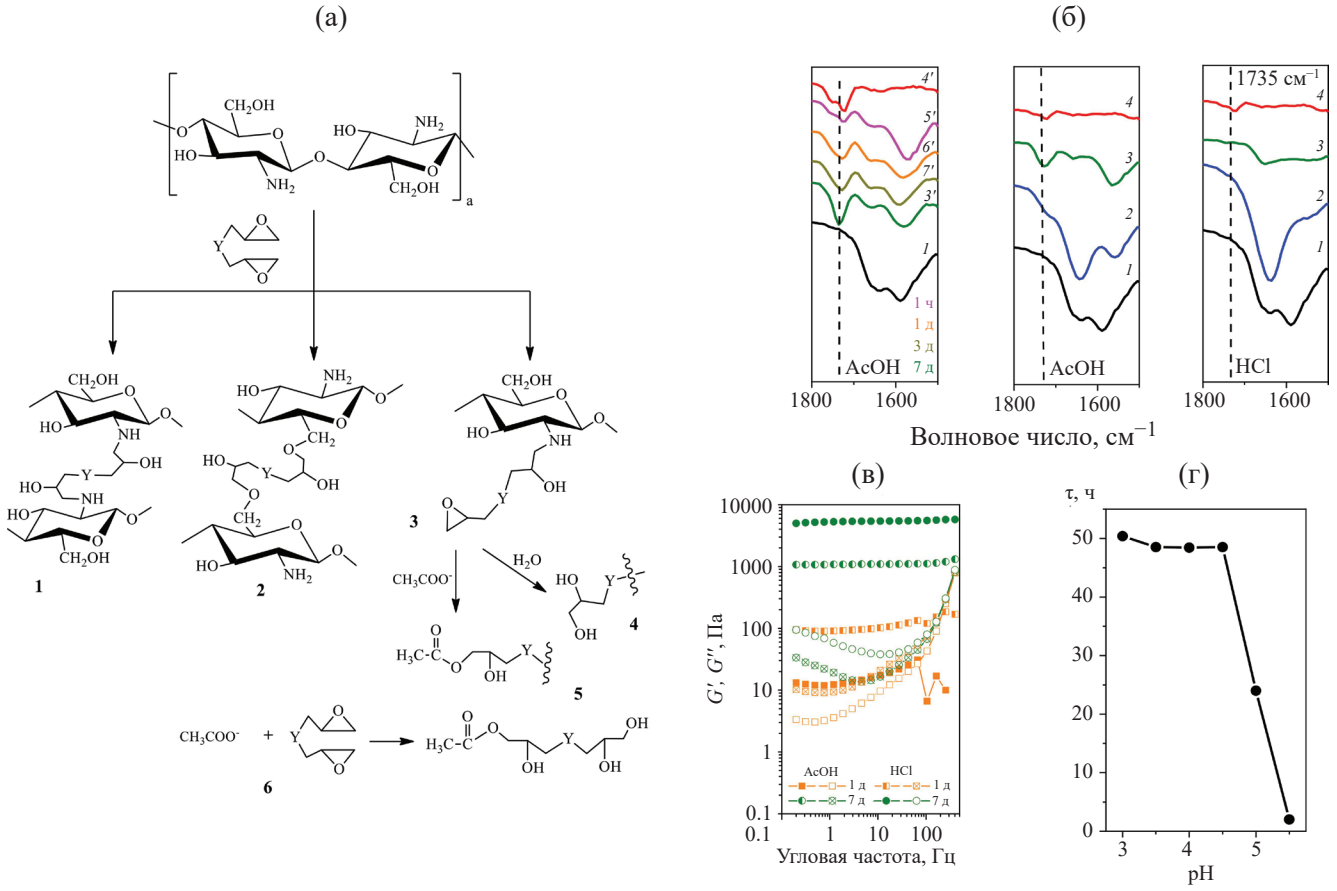


Рис. 6. Возможные реакции в солянокислых (1, 2, 3, 4) и уксуснокислых (1–6) растворах хитозана и DE (а). ИК-Фурье спектры хитозана (*1*); сшивающих реагентов DEEG (*4*) и DEPEG (*4'*); реакционных смесей (*5'*, *6' 7'*) через 1 ч, 1 и 3 дня после добавления DEPEG в уксуснокислый раствор хитозана; реакционных смесей (*3*, *3'*) через 7 дней после добавления в растворы хитозана в HCl или AcOH DEEG и DEPEG соответственно; гидрогелей (*2*) хитозан/DEEG после удаления растворимых продуктов реакции и избытка исходных реагентов из реакционных смесей (*3*) – (б). Частотные зависимости модулей накопления (G', заполненные символы) и потерь (G'', пустые символы) реакционных смесей хитозан/DEEG через один (1 д) и семь (7 д) дней после добавления DEEG в уксуснокислый (AcOH) и солянокислый (HCl) раствор хитозана (в). Зависимость времени гелеобразования от pH в солянокислом растворе хитозана в присутствии DEEG (г). Все данные получены для мольного соотношения DE/NH_2 1.0 при температуре +25°C, данные на рисунках (б) и (в) получены при pH 5.5. Рисунки адаптированы по работе [131].

Fig. 6. Possible reactions in hydrochloric acid (1, 2, 3, 4) and acetic acid (1–6) solutions of chitosan and DE (a). FTIR spectra of chitosan (*1*); crosslinking reagents DEEG (*4*) and DEPEG (*4'*); reaction mixtures (*5', 6' 7'*) 1 h, 1 and 3 days after adding DEPEG to chitosan acetic acid solution; reaction mixtures (*3, 3'*) 7 days after adding DEEG and DEPEG to chitosan solutions in HCl or AcOH, respectively; hydrogels (*2*) chitosan/DEEG after removing soluble reaction products and excess of reagents from reaction mixtures (*3*) – (b). Frequency dependences of storage modules (G', filled symbols) and losses (G'', empty symbols) of chitosan/DEEG reaction mixtures one (1 d) and seven (7 d) days after adding DEEG to acetic acid (AcOH) and hydrochloric acid (HCl) chitosan solution (b). Dependence of gelation time on pH in a hydrochloric acid solution of chitosan in the presence of DEEG (g). All data were obtained for the molar ratio of DE/NH_2 1.0 at a temperature of +25°C, the data in Figures (b) and (c) were obtained at pH 5.5. The figures are adapted from [131].

отсутствие необходимости тщательного удаления непрореагировавших сшивающих реагентов для обеспечения цито- и биосовместимости. Несмотря на достаточно высокую собственную токсичность DE [134], непрореагировавшие эпоксидные циклы раскрываются при взаимодействии с водой (Рис. 6а, реакция 4) с образованием нетоксичных продуктов. По сравнению с тиоленовым присоединением PEG-SH к производному хитозана с нонборненовыми группами в присутствии фотоинициатора, которое проходит при эквимолярном соотношении реагентов за секунды [39], сшивка хитозана DEPEG протекает значительно медленнее. Однако DEPEG на порядок дешевле, чем PEG-SH, а сшивка не требует промежуточной модификации хитозана нонборненовыми [39] или винильными группами [40] и введения дополнительных реагентов. При этом в обоих

случаях достигается повышение эластичности гидрогелей хитозана за счет включения в полимерную сетку фрагментов PEG.

ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ПОРИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

По сравнению с гидрогелями широкопористые материалы, к которым обычно относят материалы с размером пор более 50 мкм [135], обладают рядом преимуществ. Открытая пористая структура обеспечивает эффективный транспорт жидкости через весь объем материала, более высокую механическую прочность при больших деформациях, эластичность [136–138], благодаря чему пористые материалы на основе хитозана нашли применение в качестве средств доставки лекарств с контролируемым высвобождением, скаффолдов в тканевой инженерии, раневых покрытий [139–142], сорбентов для извлечения и разделения ионов [143], иммобилизации [144] и очистки белков [145].

К настоящему времени разработаны различные подходы к получению объемных пористых материалов на основе хитозана. Наиболее распространенные способы включают стадию лиофильной (сублимационной) сушки замороженных растворов хитозана или предварительно полученных гидрогелей. В простейшем варианте после лиофилизации раствора хитозана полученный пористый материал обрабатывают щелочными растворами или неводными растворителями [146], однако это не решает проблему растворимости в кислых средах.

Сочетание лиофилизации и химической сшивки можно осуществить двумя способами. При первом способе сначала с использованием сшивающего реагента в оптимальных условиях (концентрация раствора хитозана, содержание сшивающего реагента, pH) получают гидрогель, а затем формируют пористую структуру путем замораживания и лиофильной сушки [67, 119, 147]. Таким способом были получены пористые матрицы, сшитые GA и Gp, для культивирования клеток млекопитающих [67]. Матрицы, полученные с использованием GA, имели размер пор 100–200 мкм и влагоудерживающую способность до 6000%, при сшивке Gp средний размер пор составил 500 мкм, но влагоудерживающая способность была ниже. Меньший размер пор при сшивке GA обусловлен большей упругостью исходного гидрогеля хитозана. Нужно отметить, что при таком способе получения во время второй стадии – замораживания – рост кристаллов льда может приводить не только к формированию системы взаимопроникающих пор, но и к разрушению структуры сшитого геля. Этого можно избежать, если сшивку хитозана проводить уже после формирования пористой структуры материала.

Последовательность операций при втором способе получения пористых матриц иная: сначала получают криоструктурат путем лиофилизации уксуснокислого раствора хитозана, а затем проводят сшивку теми же реагентами, которые используются для получения гидрогелей хитозана. В работе [67] таким способом были получены пористые матрицы, сшитые Gp. Авторы отметили, что в этом случае появление синего цвета, характерного для ковалентно сшитого геля хитозана, наблюдали значительно позже по сравнению со сшивкой в растворе, что объясняли затрудненной диффузией Gp в гетерогенных условиях. Морфология сформированных криоструктуратов приведена на Рис. 7. Размер пор, влагоудерживающая способность и скорость биодеградации таких криоструктуратов *in vitro* зависели от мольного соотношения сшивающий реагент/аминогруппы хитозана.

Лиофилизацией уксуснокислого раствора хитозана с последующей ионной сшивкой триполифосфатом натрия получили пористые губки хитозана с диаметром пор 100–200 мкм для регенерации костной ткани [148]. Отмеченная выше проблема низкой эффективности сшивки хитозана DE в кислой среде для получения пористых материалов была частично решена с помощью трудоемкого многоэтапного подхода, включающего замену воды в замороженных растворах хитозана ацетоном при –20°C, лиофильную сушку и сшивку сухих криоструктуратов DEPEG в щелочной среде при +60°C [136].

В работе [63] сверхкритический диоксид углерода (CO_2) под давлением 60 бар использовали в качестве «зеленого» порогена для гидрогелей хитозана, сшитых GA и Gp. Таким образом были получены материалы с порами диаметром 30–40 мкм.

Получение пористых материалов методом криогелирования

Альтернативой описанным выше способам генерации пористой структуры является криогелирование или криотропное гелеобразование, заключающееся в физической или химической сшивке полимеров в частично замороженном растворе, когда темплатами служат кристаллы растворителя, легко удаляемые при оттаивании [26, 51]. Одним из специфических эффектов, характерных для формирования криогелей, является криоконцентрирование [151]. Это особенность гелеобразования в частично замороженных многокомпонентных растворах, где часть компонентов реакционной смеси вытесняется из формирующихся кристаллов растворителя и попадает в незамерзшие микроканалы, в ограниченном пространстве которых впоследствии проходит полимеризация мономеров или сшивка полимеров. Переход от режима гелеобразования к режиму криогелирования происходит за счет криоконцентрирования компонентов до начала реакции гелеобразования. В случае если замораживание раствора и образование кристаллов растворителя происходит уже после точки гелеобразования, правильная пористая структура не формируется, а лиофилизация уже сформированного геля не приводит к получению материалов, аналогичных по свойствам криогелям.

Свойства и морфология криогелей зависят от температуры гелеобразования, природы используемого

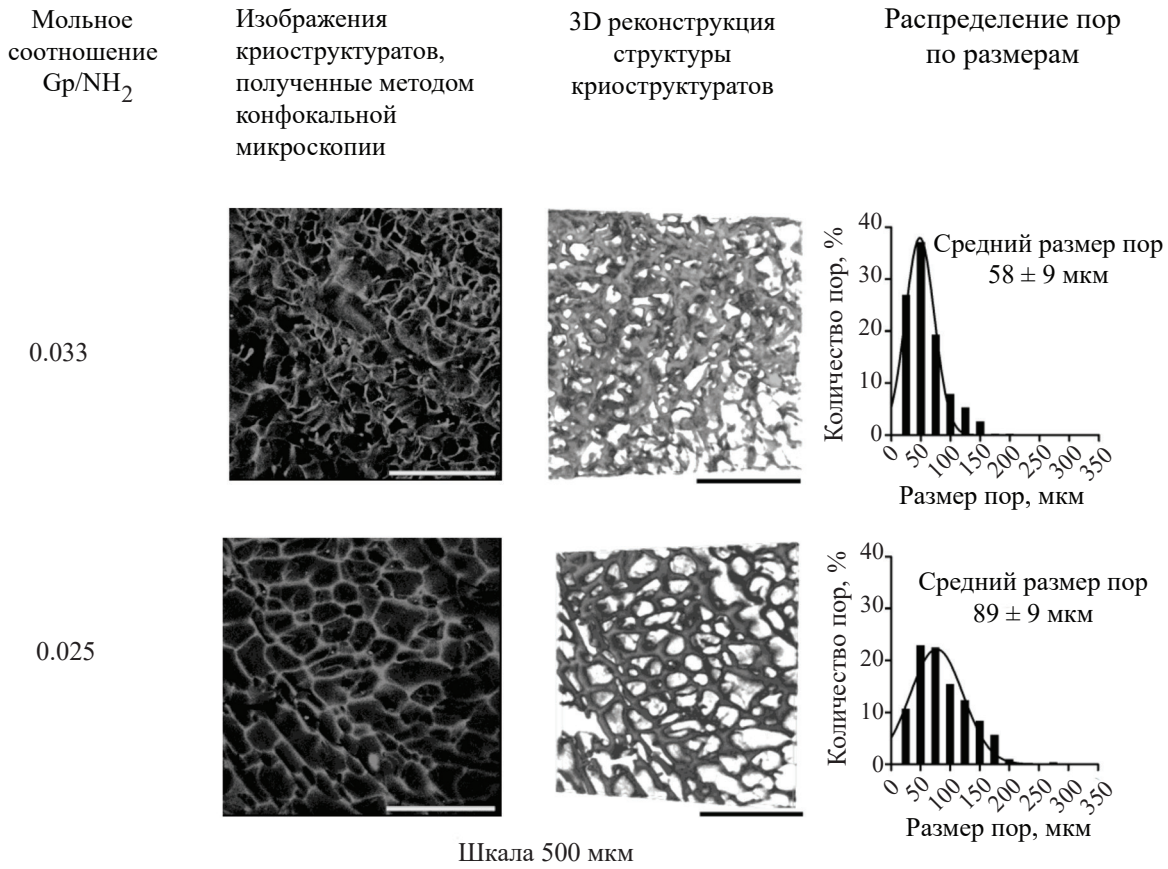


Рис. 7. Морфология хитозановых криоструктуратов, сшитых Gp [67].
Fig. 7. Morphology of chitosan cryostructurates crosslinked Gp [67].

растворителя, концентрации гелеобразующих компонентов, присутствия других растворенных веществ, скорости замораживания и оттаивания, режима замораживания, продолжительности выдержки в замороженном состоянии и некоторых других факторов [152, 153]. Размер пор, толщина и плотность стенок являются ключевыми параметрами, влияющими на характеристики криогеля. Размер пор значительно влияет на гидродинамические свойства криогелей (проницаемость для потока жидкости), а толщина и плотность стенок определяют их макроскопические механические свойства [154].

Метод криогелирования предъявляет к сшивающим реагентам дополнительные требования по реакционной способности при отрицательной температуре. Так, описанный выше способ получения пористых матриц, сшитых Gp [67], был разработан авторами после неудачной попытки сшивки в криоусловиях: для формирования хитозановых криогелей водные растворы ацетата хитозана, содержащие различные количества Gp, замораживали при –20 или –30°C и выдерживали в течение различного времени. Однако после оттаивания системы образования криогеля не происходило, что авторы объяснили снижением растворимости Gp в воде при понижении температуры и, соответственно, уменьшением его концентрации в реакционной системе. GA – жидкость с температурой замерзания около –15°C и высокой реакционной способностью, поэтому его можно использовать для сшивки хитозана в частично замороженных растворах. Долгое время GA считался фактически единственным сшивающим реагентом для получения криогелей хитозана. Но, благодаря установлению влияния природы кислоты на эффективность сшивки хитозана DE, относительно недавно удалось разработать способ получения криогелей из солянокислых растворов хитозана с применением этого перспективного типа коммерчески доступных сшивающих реагентов [70, 133].

Криогели хитозана, сшитые GA

За счет эффекта криоконентрирования и высокой реакционной способности GA, механически стабильные криогели можно получать при низких концентрациях сшивающего реагента, частично решая проблему цитотоксичности GA [155]. Влияние степени сшивки, ММ хитозана и температуры на свойства криогелей хитозана рассмотрено в ряде работ [155–157]. В растворах хитозанов с ММ 190, 467 и 600 кДа

в интервале температур от −30 до −10°C сшивка GA проходила более эффективно для хитозана с наименьшей длиной цепи [156].

Никоноров и др. [155] исследовали свойства и морфологию криогелей хитозана, сшитых GA при разных температурах (−10, −15, −25 и −30°C) и мольных соотношениях GA/NH_2 (0.2, 0.1, 0.05, 0.03, 0.025 и 0.02). При фиксированном соотношении GA/NH_2 0.2 криогели с порами наименьшего сечения (44.3 мкм) были получены при самой низкой температуре (−30°C), а с самыми крупными (72.3 мкм) – при −15°C, а не при самой высокой в ряду температуре −10°C, как можно было ожидать. Здесь нужно отметить, что зависимость выхода гель-фракции, степени набухания и проницаемости криогелей от температуры практически во всех случаях имеет форму колокола, проходя через максимум [152], что обусловлено эффектами переохлаждения раствора при температуре ниже нуля. Так, переохлаждение в растворе хитозан-GA при температуре −10°C приводит к образованию кристаллов льда меньшего размера, чем при температуре −15°C. Размер пор криогелей хитозана коррелирует с их проницаемостью [155]. Таким образом, температура замораживания и время роста кристаллов льда являются одними из наиболее эффективных инструментов управления структурой пор (Рис. 8) и гидродинамическими характеристиками криогелей без кардинального изменения их состава.

ММ хитозана, используемого для получения криогелей, ковалентно сшитых GA в умеренно замороженных растворах, существенно влияет на выход гелевой фракции, осмотические свойства сшитого полимера и пористую морфологию формируемой гелевой системы. В диапазоне ММ хитозана от 190 до 600 кДа для получения криогелей при температуре от −30 до −10°C наиболее эффективным является сшивание полимера с наименьшей длиной цепи. Авторы объясняют это явление более низкой вязкостью раствора и, как следствие, более высокой подвижностью реагентов при сшивке [157].

В работе [156] предложен метод получения криогелей хитозана с регулируемым размером пор путем жесткого контроля температурных условий на каждой из пяти стадий. Более высокая температура и более длительное время роста кристаллов приводили к образованию более крупных пор. При фиксированном времени роста кристаллов (30 мин) средний диаметр пор увеличивался с увеличением температуры замерзания и составил 60 и 135 мкм при температуре −20 и −1.5°C соответственно. Максимального размера пор (235 мкм) удалось достичь при температуре −1.5°C и времени роста кристаллов 24 ч, что позволило увеличить проницаемость криогелей в 2.5 раза.

Следует отметить, что возможность получения криогелей с низкой степенью сшивки GA, когда значительное число аминогрупп хитозана остаются свободными, позволяет осуществить его дальнейшую модификацию и функционализацию. Так, в работе [158] в результате модифицирования криогеля хитозана, сшитого GA, пиридоксаль-5'-фосфатом (ПФ), соединением, содержащим, кроме фосфатной группировки, реакционноспособную в реакциях с первичными аминами карбонильную группу, был получен новый функциональный сорбент. Строение продукта взаимодействия ПФ с хитозаном приведено на Схеме 6.

Прочно зафиксированные фосфатные группы придают поверхности криогеля отрицательный заряд, что увеличивает сорбционную емкость по отношению к ионам Cu^{2+}. Показана также возможность сорбции радионуклидов (^{154}Eu, ^{233}U) в статическом и динамическом режимах [157, 158].

Криогели хитозана, сшитые DE

Долгие годы GA остается наиболее широко используемым сшивающим реагентом для хитозана [44, 45, 159, 160]. Однако его популярность основана в большей степени на низкой стоимости и простоте применения, чем на высоком качестве получаемых материалов. GA цитотоксичен в высоких концентрациях, что ограничивает степень сшивки для биомедицинского применения [44, 45]. Сшитые GA гидрогели значительно уступают по механическим характеристикам материалам, сшитым гибкоцепными макромерами с концевыми альдегидными группами [13], а удаление непрореагировавших остатков GA и токсичного боргидрида натрия, используемого для восстановления образовавшегося основания Шиффа, может быть трудоемким и дорогостоящим [138].

Быстрое гелеобразование в растворах хитозана даже при низких концентрациях GA [42, 161] препятствует росту кристаллов растворителя в частично замороженных растворах, в результате чего формируются поры небольшого размера (как правило, менее 70 мкм) [162]. Окрашенность криогелей хитозана, сшитых GA, затрудняет наблюдение за динамикой роста клеток *in vitro* при использовании их в качестве скаффолдов.

Преимущества DE как альтернативы GA для получения криогелей заключаются в высокой стабильности материалов за счет образования в результате сшивки негидролизуемой эфирной связи, бесцветности, отсутствии цитотоксичности после гидролиза непрореагировавших эпоксидных групп, возможности настройки свойств за счет варьирования не только степени сшивки, но длины цепи DE.

Вследствие более низкой реакционной способности DE время гелеобразования в растворах хитозана в их присутствии увеличивается в десятки раз относительно GA [133]. Медленное увеличение вязкости в растворах DE-хитозан не препятствует росту кристаллов льда, что обеспечивает формирование криогелей с размером пор 150–230 мкм (Рис. 9а), что в среднем в 3–4 раза больше по сравнению с размером пор криогелей, сшитых GA. За счет большого размера пор в слабосшитых криогелях (мольное соотношение DE/NH_2 0.05) они характеризуются высокой проницаемостью (Рис. 9б) при влагоудерживающей способности 5500–9000%, значительный вклад в которую вносит вода в поровом пространстве (Рис. 9в). За счет того, что с ростом длины

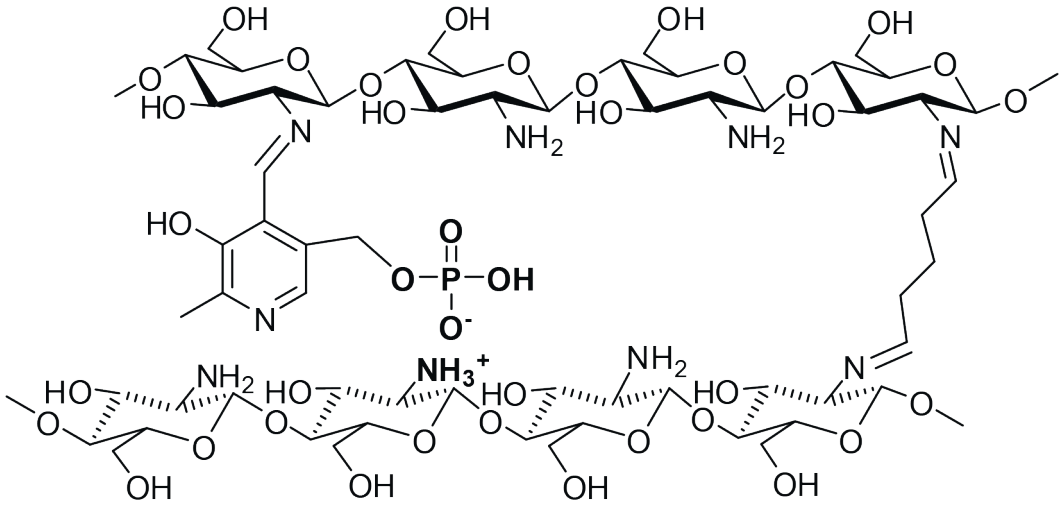


Схема 6. Строение продукта взаимодействия ПФ с хитозаном.
Scheme 6. The structure of the product of PP interaction with chitosan.

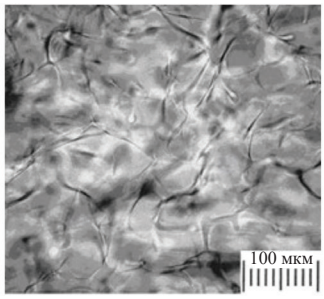
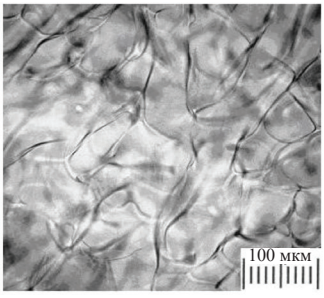
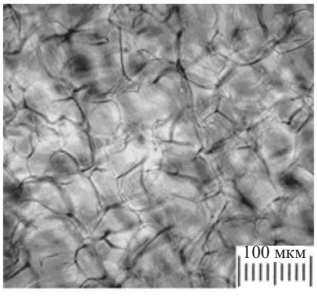
Температура синтеза криогеля, °C	−10	−15	−30
Микрофотографии поверхности криогелей			
Средний размер пор, мкм	57.4	72.3	44.3
Скрость протекания воды через 5-мл колонку с криогелем, мл/ч	195	220	65

Рис. 8. Влияние температуры замораживания на пористую структуру криогеля хитозана с ММ 470 кДа, сшитого GA при мольном соотношении GA/NH_2 0.05 [155].
Fig. 8. The effect of freezing temperature on the porous structure of chitosan cryogel with 470 kDa MM crosslinked with GA at a molar ratio of GA/NH_2 0.05 [155].

цепи DE увеличивается степень гидратации сшивок, и, соответственно, уменьшается просвет пор, наиболее высокой проницаемостью характеризуются криогели, сшитые DEEG, а низкой – DEPEG. Это необходимо учитывать при выборе сшивающего реагента в зависимости от назначения материала. Так, в качестве сорбентов предпочтительнее использовать криогели, сшитые DEEG, с максимальной проницаемостью и минимальной толщиной стенок пор [163]. С учетом этого быстрое гелеобразование в течение нескольких секунд путем тиол-енового присоединения [39], вероятно, также будет минусом при получения криогелей хитозана с использованием этого типа сшивки.

По сравнению с криогелями, сшитыми GA, DE позволяют получать более эластичные криогели, восстанавливающие форму на 90–99% после деформации на 75–80% в цикле одноосного сжатия (Рис. 9д), в отличие от криогелей, сшитых GA при тех же мольных соотношениях (Рис. 9г). Удельная потенциальная энергия деформации (Рис. 9е), нагрузка при сжатии и гистерезис уменьшаются с ростом длины цепи DE и понижением степени сшивки, обеспечивая

возможность направленно изменять механические свойства криогелей хитозана, варьируя их состав [133].

3D полимерные скаффолды, обеспечивающие механическую поддержку клеток при культивировании и имитирующие *in vitro* характеристики внеклеточного матрикса *in vivo*, широко востребованы в клеточных технологиях. По сравнению с двухмерными (2D) моделями, 3D клеточные модели лучше передают физиологические особенности клеточных культур и демонстрируют большой потенциал для разработки более адекватных моделей опухолей для изучения гипоксии, агрегации, кластеризации, миграции и пролиферации клеток [164], а также устойчивости опухолей к действию химиопрепаратов [165].

Перспективными трехмерными клеточными структурами, наиболее приближенными к реальным опухолевым тканям, являются многоклеточные опухолевые сфероиды, выращенные в полимерных матрицах. Недостатками непористых гелевых матриц является формирование барьера для диффузии кислорода и питательных веществ в объем геля [166]. Успешное культивирование опухолевых клеток и со-культивирование их с клетками нормальных тканей требует жесткого контроля таких параметров скаффолдов, как пористость, химия поверхности, механические свойства и др. Так, было показано, что морфология клеточных агрегатов HCT 116 заметно отличается при культивировании в криогелях хитозана с различной пористой структурой и механическими характеристиками [69, 134]. В более мягких криогелях, полученных при мольном соотношении DEPEG/NH_2 0.08, уже на третьи сутки культивирования формируются компактные клеточные сфероиды с плотными межклеточными контактами, размер которых к 14-м суткам превышал 100 мкм. В более жестком криогеле, полученном при мольном соотношении DEBD/NH_2 0.25, морфология клеточных агрегатов отличалась в сторону преобладания контактов клеток с полимерной матрицей, в результате чего агрегаты представляли собой рыхлые структуры, в большей степени распластывающиеся по стенкам пор (Рис. 10) [69].

Биосовместимость криогелей хитозана, сшитых DE, подтверждена исследованиями *in vivo* [70]: через 14 дней после имплантации в бедренную мышцу мыши криогелей, полученных при мольном соотношении DEEG/NH_2 0.25, модуль Юнга 35 ± 8 кПа, умеренная воспалительная реакция вокруг имплантатов сопровождалась формированием нормальной грануляционной ткани. Отсутствовали также изменения в печени и селезенке, которые могли бы быть вызванными низкомолекулярными продуктами деградации имплантата. Для биомедицинского применения большой интерес представляет возможность управления скоростью биорезорбции как имплантатов, так и средств доставки лекарств. Как правило, снижение в результате сшивки количества структурных фрагментов, доступных для ферментативной атаки [19, 167], и скорости диффузии фермента [168] приводят к снижению скорости ферментативной деградации материалов. В немногочисленных известных к настоящему времени исследованиях ферментативной деградации хитозана и других полисахаридов, сшитых DE, были получены противоречивые данные. Низкая и плохо контролируемая устойчивость к ферментативному гидролизу пленок хитозана, сшитых DEBD и DEPEG, отмеченная в работах [19, 169], вероятно, является результатом низкой степени сшивки в гетерогенных условиях в метаноле [19] или в растворе уксусной кислоты [169].

Систематические исследования скорости деградации криогелей хитозана, сшитых DE, в присутствии специфического фермента β-глюканазы показали, что максимальная потеря массы (более 95%) за 24 ч наблюдалась для наиболее мягкого и эластичного криогеля, сшитого DEPEG при мольном соотношении DE : хитозан 1 : 20 [133]. При этом константа скорости деградации, рассчитанная по кинетическому уравнению псевдопервого порядка, снизилась в 612 раз при увеличении концентрации DEPEG в 20 раз, что делает устойчивость к ферментативному гидролизу параметром, наиболее чувствительным к условиям сшивки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование сшивающих реагентов разного строения является мощным инструментом для направленного дизайна и тонкой настройки свойств функциональных материалов на основе хитозана. Выбор конкретного сшивающего агента определяется не только его доступностью и реакционной способностью, но и целевым назначением создаваемого материала. Наиболее распространенный сшивающий реагент – глутаровый альдегид (GA), несмотря на высокую реакционную способность и простоту применения, формирует продукты сложного состава из-за склонности к олигомеризации, что ассоциировано с потенциальной цитотоксичностью при высоких степенях сшивки. Это ограничение сужает потенциал GA для создания матриксов, механические свойства которых охватывают широкий диапазон, необходимый для имитации микроокружения различных типов тканей в клеточных технологиях и регенеративной медицине. При этом GA является очень удобным сшивающим реагентом для получения мягких гидрогелей с быстрым временем гелеобразования и сорбентов различного назначения.

Природное соединение – дженипин (Gp) представляет собой перспективную альтернативу GA для биомедицинского применения, многочисленные сравнительные исследования подтверждают низкую цитотоксичность и высокую биосовместимость материалов, даже при высоких степенях сшивки Gp. Однако его использование так же, как и использование GA, осложнено сопутствующими реакциями радикальной полимеризации. Интенсивная окраска сшитых Gp материалов является ограничением для применения в оптических устройствах или в *in vitro* исследованиях с наблюдением за динамикой роста клеточных культур в оптический микроскоп. Альтернативные диальдегиды, такие как окисленные производные нуклеотидов (oAMP, oUMP), обладают более предсказуемой

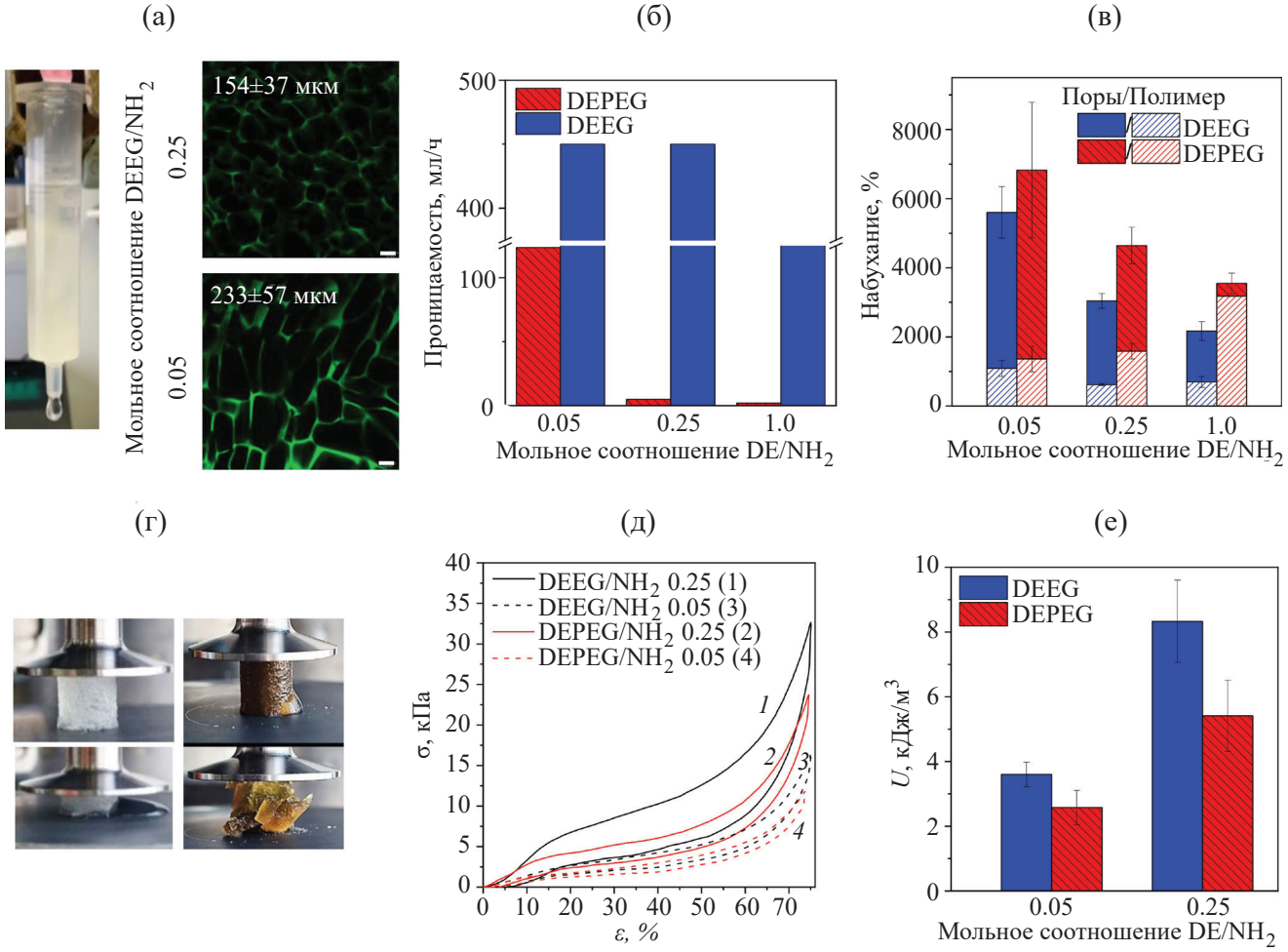


Рис. 9. Внешний вид криогеля хитозана, сшитого DEEG, изображения поперечных срезов, полученные методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, и средние размеры пор криогелей, сшитых DEEG при мольных соотношениях DEEG/NH_2 0.25 и 0.05, шкала – 100 мкм (а). Проницаемость (б) и набухание (в) криогелей хитозана, полученных при разных мольных соотношениях DE/NH_2. Фотоизображения криогелей DEBD/хитозан (слева) и GA/хитозан (справа), полученных при мольном соотношении сшивающий реагент/NH_2 0.25, до и в процессе приложения нагрузки (г). Деформационные кривые, записанные в цикле «нагрузка-разгрузка» при одноосном сжатии набухших криогелей хитозана (д) и потенциальная энергия деформации криогелей (е). Адаптировано по работе [133].

Fig. 9. Appearance of chitosan cryogel crosslinked with DEEG, cross-sectional images obtained by laser scanning confocal microscopy, and average pore sizes of cryogels crosslinked with DEEG at molar ratios DEEG/NH_2 0.25 and 0.05, scale – 100 microns (a). Permeability (b) and swelling (c) of chitosan cryogels obtained at different molar ratios of DE/NH_2. Photographic images of cryogels DEBD/chitosan (left) and GA/chitosan (right) obtained with a molar ratio of crosslinking reagent/NH_2 0.25, before and during the application of the load (d). Deformation curves recorded in the load-unloading cycle during uniaxial compression of swollen chitosan cryogels (e) and the potential deformation energy of cryogels (f). Adapted from [133].

структурой и обеспечивают одновременно ковалентную и ионную сшивку.

Ключевым фактором, определяющим как кинетику, так и механизм сшивки диальдегидами, является контроль кислотности среды: pH влияет не только на число реакционно-способных аминогрупп, но и на равновесие сложных химических превращений полифункциональных сшивающих реагентов с альдегидными группами. Сшивку, как правило, проводят в уксуснокислых растворах хитозана, эффективность реакции в солянокислых растворах ниже.

Динамическая природа иминных связей, формируемых при взаимодействии хитозана с ароматическими и гидрофобными алифатическими моноальдегидами, легла в основу создания широкого спектра стимул-чувствительных (к pH, температуре, присутствию аминокислот) и самозалечивающихся материалов. Уникальность таких производных хитозана заключается

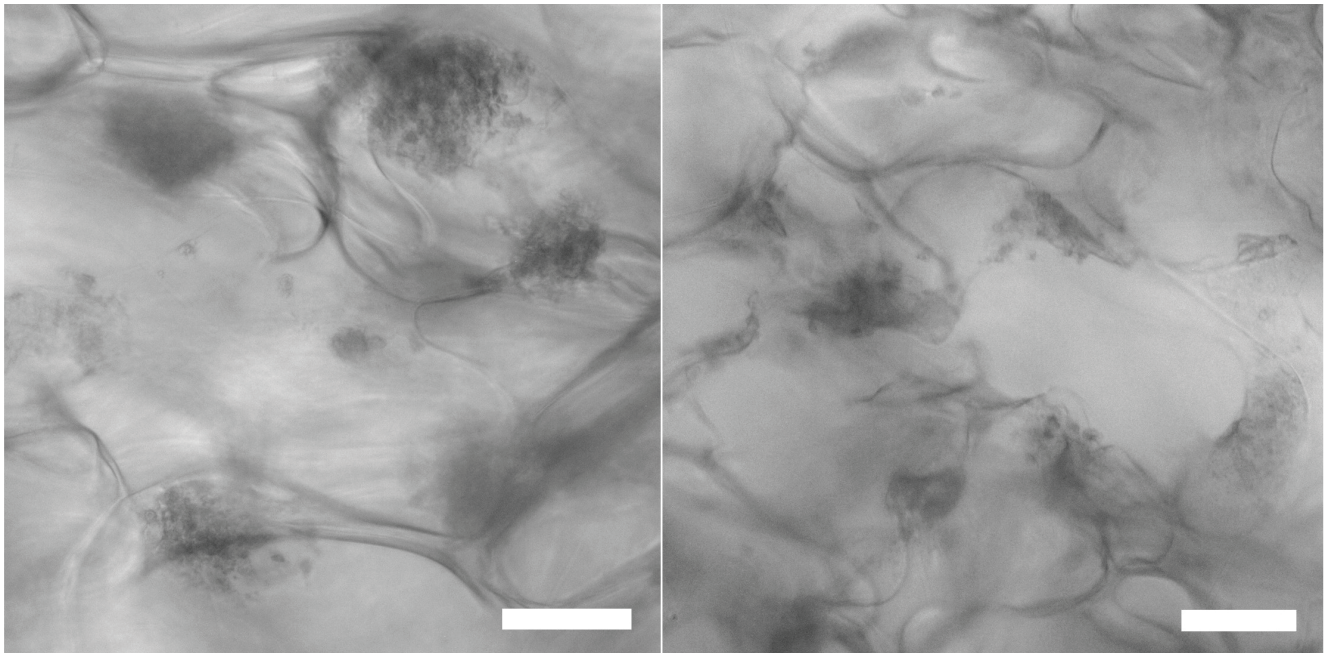


Рис. 10. Общий вид клеточных структур HCT 116 через 7 дней культивирования в криогелях хитозана, сшитых DEPEG (слева) и DEBD (справа) при отношении DE/NH_2 0.083 и 0.25 соответственно, масштабная линейка: 100 мкм [69].

Fig. 10. General view of the cellular structures of HCT 116 after 7 days of cultivation in cryogels chitosan crosslinked with DEPEG (left) and DEBD (right) at a DE/NH_2 ratio of 0.083 and 0.25, respectively, scale bar: 100 microns [69].

в их способности к самопроизвольной организации в упорядоченные надмолекулярные структуры, стабилизированные гидрофобными взаимодействиями и водородными связями, которые выступают в роли узлов физической сшивки, обеспечивая хорошие механические свойства без образования ковалентных межмолекулярных связей. Благодаря собственной высокой биологической активности альдегидов, такой подход позволяет получать гидрогели, ксерогели, пленки и эмульсии с фунгицидными, антимикробными, противоопухолевыми, антиоксидантными и другими привлекательными свойствами, управлять которыми можно варьируя pH среды и природу альдегида. Однако по сравнению со сшивкой диальдегидами гелеобразование в таких системах происходит при более высоких мольных соотношениях альдегид/NH_2, что при определенных условиях может отрицательно влиять на цитосовместимость полученных материалов. Еще одной особенностью сшивки моноальдегидами является низкая степень конверсии в растворах, в результате чего для повышения стабильности гидрогели лиофилизуют с получением пористых объемных материалов или сушат для получения пленок.

Существенный прогресс в преодолении ограничений, присущих сшивающим реагентам с альдегидными группами, связан с применением для сшивки хитозана в кислой среде в гомогенных условиях коммерчески доступных и недорогих диглицидиловых эфиров (DE). Ранее DE применяли только для биополимеров, растворимых в нейтральной и щелочной среде. В отличие от сшивки реагентами с альдегидной группой, оптимальной средой для сшивки хитозана DE являются солянокислые растворы, так как в уксуснокислых растворах DE расходуется на побочную реакцию этерификации уксусной кислоты, что резко снижает эффективность сшивки. Как и в случае сшивки хитозана GA и Gp, скорость гелеобразования в присутствии DE растет при повышении pH и снижении степени протонирования аминогруппы. Ключевыми преимуществами DE при относительно невысокой стоимости являются бесцветность получаемых материалов, что делает их удобными для наблюдений за динамикой роста клеток в *in vitro* исследованиях и применения в оптических устройствах, а также гидролитическая устойчивость образующихся эфирных связей и отсутствие необходимости тщательного удаления непрореагировавшего сшивающего реагента, как это требуется в случае GA.

Особое внимание в обзоре уделено получению пористых материалов на основе хитозана методом криогелирования – ковалентной сшивки полимеров в частично замороженных растворах. Сшивка хитозана при отрицательных температурах приводит к получению макропористых материалов (криогелей) при меньших количествах сшивающего реагента, повышая их биосовместимость или сорбционную емкость за счет сохранения свободных аминогрупп. Открытая пористая структура обеспечивает эффективный транспорт жидкости через весь объем материала и более высокую

эластичность по сравнению с гидрогелями, что имеет важное значение для применения хитозана качестве средств доставки лекарств с контролируемым высвобождением, скаффолдов в тканевой инженерии, раневых покрытий и сорбентов.

При этом метод криотропного гелеобразования предъявляет дополнительные требования к сшивающим реагентам: они должны быть растворимы и достаточно реакционноспособны при отрицательных температурах при pH > 5. Низкая растворимость кристаллического Gp препятствует его использованию в условиях криотропного гелеобразования, в связи с чем пористые материалы, сшитые Gp, можно получить только в форме криоструктуратов. Несмотря на высокую реакционную способность GA, высокая скорость гелеобразования в его присутствии ограничивает возможность управления пористой структурой криогелей, так как резкое повышение вязкости растворов препятствует росту кристаллов растворителя. Более низкая реакционная способность DE в случае криотропного гелеобразования является преимуществом, позволяющим получать высокопроницаемые криогели с размером пор более 200 мкм. А благодаря коммерческой доступности DE с разной длиной цепи реализуется возможность настройки механических свойств и устойчивости к ферментативной деградации криогелей и значительное повышение их эластичности по сравнению с криогелями, сшитыми GA.

В заключение следует отметить, что сшивающие реагенты играют ключевую роль в улучшении структурной целостности и функциональности материалов, а поиск оптимальных стратегий сшивки хитозана продолжает стимулировать развитие инновационных направлений на стыке современной химии (установление механизмов сложных превращений), биомедицины (создание искусственного внеклеточного матрикса), экологии (сорбенты нового поколения) и фармакологии (системы контролируемой доставки лекарств). Несмотря на многообещающие результаты, проблемы токсичности большинства сшивающих реагентов и хрупкости материалов на основе хитозана остаются актуальными и определяют потребность в дальнейшем усовершенствовании способов сшивки и формования материалов на основе хитозана, имеющих ключевое значение для их внедрения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chelu M., et al.* Chitosan hydrogels for water purification applications // Gels. 2023. V. 9. № 8. P. 664. https://doi.org/10.3390/gels9080664
2. *Azarova Y.A., et al.* Application of chitosan and its N-heterocyclic derivatives for preconcentration of noble metal ions and their determination using atomic absorption spectrometry // Carbohydr. Polym. 2015. V. 134. P. 680–686. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.086
3. *Franconetti A., et al.* Native and modified chitosan-based hydrogels as green heterogeneous organocatalysts for imine-mediated Knoevenagel condensation // Appl. Catal. A Gen. 2016. V. 517. P. 176–186. https://doi.org/10.1016/j.apcata.2016.03.012
4. *Guibal E.* Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review // Prog. Polym. Sci. 2005. V. 30. № 1. P. 71–109. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.12.001
5. *Tian B., et al.* Chemical and physical chitosan hydrogels as prospective carriers for drug delivery: a review // J. Mater. Chem. B. 2020. V. 8. № 44. P. 10050–10064. https://doi.org/10.1039/D0TB01869D
6. *Tian B., Liu J.* Smart stimuli-responsive chitosan hydrogel for drug delivery: A review // Int. J. Biol. Macromol. 2023. V. 235. P. 123902. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123902
7. *Berger J., et al.* Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2004. V. 57. № 1. P. 19–34. https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00161-9
8. *Pestov A., Bratskaya S.* Chitosan and its derivatives as highly efficient polymer ligands // Molecules. 2016. V. 21. № 3. P. 330. https://doi.org/10.3390/molecules21030330
9. *Alves N.M., Mano J.F.* Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications // Int. J. Biol. Macromol. 2008. V. 43. № 5. P. 401–414. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.09.007
10. *Dong J., et al.* Hydrophilic chitosan: modification pathways and biomedical applications // Russ. Chem. Rev. 2024. V. 93. № 5. P. RCR5120. https://doi.org/10.59761/RCR5120

11. *Crompton K.E., et al.* Morphology and gelation of thermosensitive chitosan hydrogels // Biophys. Chem. 2005. V. 117. № 1. P. 47–53.
https://doi.org/10.1016/j.bpc.2005.03.009

12. *Marin L., et al.* Hydrogelation of chitosan with monoaldehydes towards biomaterials with tuned properties // In: New Trends in Macromolecular and Supramolecular Chemistry for Biological Applications. 2021. P. 345–356.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-57456-7_17

13. *Yeh Y., et al.* The role of aldehyde-functionalized crosslinkers on the property of chitosan hydrogels // Macromol. Biosci. 2022. V. 22. № 5. P. 2100477.
https://doi.org/10.1002/mabi.202100477

14. *Tsai C.-C., et al.* Injectable, shear-thinning, self-healing, and self-cross-linkable benzaldehyde-conjugated chitosan hydrogels as a tissue adhesive // Biomacromolecules. 2024. V. 25. № 2. P. 1084–1095.
https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c01117

15. *Li Q., et al.* The design, mechanism and biomedical application of self-healing hydrogels // Chinese Chem. Lett. 2017. V. 28. № 9. P. 1857–1874.
https://doi.org/10.1016/j.cclet.2017.05.007

16. *Pan C., et al.* Study on the relationship between crosslinking degree and properties of TPP crosslinked chitosan nanoparticles // Carbohydr. Polym. 2020. V. 241. P. 116349.
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116349

17. *Liang J., et al.* The impact of cross-linking mode on the physical and antimicrobial properties of a chitosan/bacterial cellulose composite // Polymers (Basel). 2019. V. 11. № 3. P. 491.
https://doi.org/10.3390/polym11030491

18. *Ul'yabaeva G.R., et al.* Adsorption of an acid textile dye from aqueous solutions by a chitosan-containing polyvinyl alcohol composite cryogel // Fibre Chem. 2019. V. 51. № 3. P. 199–203.
https://doi.org/10.1007/s10692-019-10074-9

19. *Subramanian A., et al.* Crosslinked chitosan: its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation // J. Biomed. Mater. Res. – Part A. 2005. V. 75. № 3. P. 742–753.
https://doi.org/10.1002/jbm.a.30489

20. *Cha C., et al.* Biodegradable polymer crosslinker: Independent control of stiffness, toughness, and hydrogel degradation rate // Adv. Funct. Mater. 2009. V. 19. № 19. P. 3056–3062.
https://doi.org/10.1002/adfm.200900865

21. *Manickam B., et al.* 'Genipin' – the natural water soluble cross-linking agent and its importance in the modified drug delivery systems: An overview // Curr. Drug Deliv. 2014. V. 11. № 1. P. 139–145.
https://doi.org/10.2174/15672018113106660059

22. *Ahmadi F., et al.* Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications // Res. Pharm. Sci. 2015. V. 10. № 1. P. 1–16.

23. *Reddy N., et. al.* Crosslinking biopolymers for biomedical applications // Trends Biotechnol. 2015. V. 33. № 6. P. 362–369.
https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008

24. *Yammine P., et al.* Types of crosslinkers and their applications in biomaterials and biomembranes // Chem. 2025. V. 7. № 2. P. 61.
https://doi.org/10.3390/chemistry7020061

25. *Ma P.X.* Biomimetic materials for tissue engineering // Adv. Drug Deliv. Rev. 2008. V. 60. № 2. P. 184–198.
https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.041

26. *Fu J., et al.* The chitosan hydrogels: from structure to function // New J. Chem. 2018. V. 42. № 21. P. 17162–17180.
https://doi.org/10.1039/C8NJ03482F

27. *Rajabi M., et al.* Chitosan hydrogels in 3D printing for biomedical applications // Carbohydr. Polym. 2021. V. 260. P. 117768.
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117768

28. *Hu J., et al.* Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering // Acta Biomater. 2012. V. 8. № 5. P. 1730–1738.
https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.029

29. *Hong F., et al.* Chitosan-based hydrogels: from preparation to applications, a review // Food Chem. X. 2024. V. 21. P. 101095.
https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.101095

30. *Jing H., et al.* Facile synthesis of pH-responsive sodium alginate/carboxymethyl chitosan hydrogel beads promoted by hydrogen bond // Carbohydr. Polym. 2022. V. 278. P. 118993. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118993

31. *Enache A.-C., et al.* Evaluation of physically and/or chemically modified chitosan hydrogels for proficient release of insoluble nystatin in simulated fluids // Gels. 2022. V. 8. № 8. P. 495. https://doi.org/10.3390/gels8080495

32. *Ye J., et al.* Advances in hydrogels based on dynamic covalent bonding and prospects for its biomedical application // Eur. Polym. J. 2020. V. 139. P. 110024. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110024

33. *Huang S., et al.* An overview of dynamic covalent bonds in polymer material and their applications // Eur. Polym. J. 2020. V. 141. P. 110094. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110094

34. *Picchioni F., et. al.* Hydrogels based on dynamic covalent and non covalent bonds: A chemistry perspective // Gels. 2018. V. 4. № 1. P. 21. https://doi.org/10.3390/gels4010021

35. *Li Y., et al.* Preparation of chitosan-based injectable hydrogels and its application in 3D cell culture // J. Vis. Exp. 2017. V. 2017. № 127. P. 1–7. https://doi.org/10.3791/56253

36. *Maiz-Fernández S., et al.* Dynamic and self-healable chitosan/hyaluronic acid-based in situ-forming hydrogels // Gels. 2022. V. 8. № 8. P.477. https://doi.org/10.3390/gels8080477

37. *Pei M., et al.* Photocrosslinkable chitosan hydrogels and their biomedical applications // J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. 2019. V. 57. № 18. P. 1862–1871. https://doi.org/10.1002/pola.29305

38. *Truong V.X., et al.* In situ-forming robust chitosan-poly(ethylene glycol) hydrogels prepared by copper-free azide–alkyne click reaction for tissue engineering // Biomater. Sci. 2014. V. 2. № 2. P. 167–175. https://doi.org/10.1039/C3BM60159E

39. *Michel S.E.S., et al.* Tunable thiol–ene photo-cross-linked chitosan-based hydrogels for biomedical applications // ACS Appl. Bio Mater. 2020. V. 3. № 11. P. 8075–8083. https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01171

40. *Roas-Escalona N., et al.* Chitosan-based hydrogels: influence of crosslinking stategy on rheological properties // Carbohydr. Polym. 2024. V. 341. P. 122329. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122329

41. *Ruiz-Pardo C., et al.* Chitosan hydrogels based on the Diels–Alder click reaction: Rheological and kinetic study // Polymers. 2022. V. 14. № 6. P. 1202. https://doi.org/10.3390/polym14061202

42. *Carmona P., et al.* Glyceraldehyde as an efficient chemical crosslinker agent for the formation of chitosan hydrogels // Gels. 2021. V. 7. № 4. P. 186. https://doi.org/10.3390/gels7040186

43. *Yu Y., et al.* Genipin-cross-linked hydrogels based on biomaterials for drug delivery: a review // Biomater. Sci. 2021. V. 9. № 5. P. 1583–1597. https://doi.org/10.1039/D0BM01403F

44. *Martínez-Mejía G., et al.* Synthesis of new chitosan-glutaraldehyde scaffolds for tissue engineering using Schiff reactions // Colloids Surfaces A. Physicochem. Eng. Asp. 2019. V. 579. P. 123658. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123658

45. *Pinto R. V., et al.* Glutaraldehyde-crosslinking chitosan scaffolds reinforced with calcium phosphate spray-dried granules for bone tissue applications // Mater. Sci. Eng. C. 2020. V. 109. P. 110557. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110557

46. *Harish Prashanth K.V., Tharanathan R.N.* Crosslinked chitosan – Preparation and characterization // Carbohydr. Res. 2006. V. 341. № 1. P. 169–173. https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.10.016

47. *Beppu M.M., et al.* Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption // J. Memb. Sci. 2007. V. 301. № 1–2. P. 126–130. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.06.015

48. *Pestov A., et al.* Chitosan cross-linking with acetaldehyde acetals // Biomimetics. 2022. V. 7. № 1. P. 10. https://doi.org/10.3390/biomimetics7010010

49. *Mikhailov S.N., et al.* Crosslinking of chitosan with dialdehyde derivatives of nucleosides and nucleotides. Mechanism and comparison with glutaraldehyde // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2016. V. 35. № 3. P. 114–129. https://doi.org/10.1080/15257770.2015.1114132

50. *Wegrzynowska-Drzymalska K., et al.* Crosslinking of chitosan with dialdehyde chitosan as a new approach for biomedical applications // Materials (Basel). 2020. V. 13. № 15. P. 3413. https://doi.org/10.3390/ma13153413

51. *Monteiro O.A., et al.* Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system // Int. J. Biol. Macromol. 1999. V. 26. № 2–3. P. 119–128. https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00068-9

52. *Li B., et al.* Synthesis, characterization, and antibacterial activity of cross-linked chitosan-glutaraldehyde // Mar. Drugs. 2013. V. 11. № 5. P. 1534–1552. https://doi.org/10.3390/md11051534

53. *Kil'deeva N.R., et al.* Peculiarities of obtaining biocompatible films based on chitosan cross linked by genipin // Polym. Sci. Ser. D. 2017. V. 10. № 2. P. 189–193. https://doi.org/10.1134/S1995421217020095

54. *Potthast A., et al.* Studies on oxidative modifications of cellulose in the periodate system: Molecular weight distribution and carbonyl group profiles // Holzforschung. 2007. V. 61. № 6. P. 662–667. https://doi.org/10.1515/HF.2007.099

55. *Dyatlov V.A., et al.* Change of polysaccharide molecular-weight distribution and fraction homogeneity after periodate oxidation // Chem. Nat. Compd. 2014. V. 50. № 6. P. 973–977. https://doi.org/10.1007/s10600-014-1139-x

56. *Meade S.J., et al.* The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure–activity study // Bioorg. Med. Chem. 2003. V. 11. № 6. P. 853–862. https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00564-3

57. *Kildeeva N.R., et al.* About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde // Russ. J. Bioorganic Chem. 2009. V. 35. № 3. P. 360–369. https://doi.org/10.1134/S106816200903011X

58. *Mikhailov S.N., Kildeeva N.R.* Mechanisms of chemical cross-linking of chitosan with aldehyde derivatives // Izv. Ufim. Nauchnogo Tsentra RAN. 2018. V. 2. № 3. P. 67–71. https://doi.org/10.31040/2222-8349-2018-2-3-67-71

59. *Kawase M., et al.* Application og glutaraldehyde-crosslinked chitosan as a scaffold for hepatocyte attachment // Biol. Pharm. Bull. 1997. V. 20. № 6. P. 708–710. https://doi.org/10.1248/bpb.20.708

60. *Martínez-Mejía, G., et al.* Synthesis of new chitosan-glutaraldehyde scaffolds for tissue engineering using Schiff reactions // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2019. V. 579. P. 123658. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123658

61. *Hoffmann B., et al.* Glutaraldehyde and oxidised dextran as crosslinker reagents for chitosan-based scaffolds for cartilage tissue engineering // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2009. V. 20. P. 1495–1503. https://doi.org/10.1007/s10856-009-3707-3

62. *Mi F.-L., et al. In vivo* biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant // Biomaterials. 2002. V. 23. № 1. P. 181–191. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00094-1

63. *Ji C., et al.* Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas CO_2 // Acta Biomater. 2011. V. 7. № 4. P. 1653–1664. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.043

64. *Kil'deeva N.R., et al.* Biodegradable scaffolds based on chitosan: Preparation, properties and use for the cultivation of animal cells // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52. P. 515–524. https://doi.org/10.1134/S0003683816050094

65. *Lai J.-Y.* Biocompatibility of genipin and glutaraldehyde cross-linked chitosan materials in the anterior chamber of the eye // Int. J. Mol. Sci. 2012. V. 13. № 9. P. 10970–10985. https://doi.org/10.3390/ijms130910970

66. *Mi F.-L., et al. In vitro* evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2001. V. 12. № 8. P. 835–850. https://doi.org/10.1163/156856201753113051

67. *Sazhnev N.A., et al.* Preparation of chitosan cryostructurates with controlled porous morphology and their use as 3D-scaffolds for the cultivation of animal cells // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 5. P. 459–467. https://doi.org/10.1134/S0003683818050162

68. *Olaru A.-M., et al.* Biocompatible chitosan based hydrogels for potential application in local tumour therapy // Carbohydr. Polym. 2018. V. 179. P. 59–70. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.066

69. *Privar Y., et al.* Chitosan cryogels cross-linked with 1,1,3-triglycidyloxypropane: Mechanical properties and cytotoxicity for cancer cell 3D cultures // Biomimetics. 2023. V. 8. № 2. P. 228. https://doi.org/10.3390/biomimetics8020228

70. *Privar Y., et al.* Chitosan gels and cryogels cross-linked with diglycidyl ethers of ethylene glycol and polyethylene glycol in acidic media // Biomacromolecules. 2019. V. 20. № 4. P. 1635–1643. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01817

71. *Rinaudo M.* New way to crosslink chitosan in aqueous solution // Eur. Polym. J. 2010. V. 46. № 7. P. 1537–1544. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.04.012

72. *Singh A., et al.* External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde // Bull. Mater. Sci. 2006. V. 29. № 3. P. 233–238. https://doi.org/10.1007/BF02706490

73. *Du W., et al.* Preparation, characterization, and adsorption properties of chitosan microspheres crosslinked by formaldehyde for copper (II) from aqueous solution // J. Appl. Polym. Sci. 2009. V. 111. № 6. P. 2881–2885. https://doi.org/10.1002/app.29247

74. *Zakharova A.N., et al.* Dialdehyde derivatives of nucleosides and nucleotides as novel crosslinking reagents and their comparison with glutaraldehyde // Collection Symposium Series. Prague: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic. 2011. V. 12. P. 254–258. https://doi.org/10.1135/css201112254

75. *Михайлов С.Н. и др.* Об определении степени сшивки хитозана в реакции с диальдегидами // Известия уфимского научного центра РАН. 2016. Т. 3. № 1. С. 72–75.

76. *Azarova A.I., et al.* Gel formation in polymeric composites for modification of fibrous materials // Fibre Chem. 2011. V. 43. № 2. P. 129–133. https://doi.org/10.1007/s10692-011-9319-y

77. *Wang W., et al.* Preparation and comparison of dialdehyde derivatives of polysaccharides as cross-linking agents // Int. J. Biol. Macromol. 2023. V. 236. P. 123913. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123913

78. *Muzzarelli R.A.A.* Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids // Carbohydr. Polym. 2009. V. 77. № 1. P. 1–9. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016

79. *Butler M.F., et al.* Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin // J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. 2003. V. 41. № 24. P. 3941–3953. https://doi.org/10.1002/pola.10960

80. *Mi F., et al.* Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin // J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. 2005. V. 43. № 10. P. 1985–2000. https://doi.org/10.1002/pola.20669

81. *Muzzarelli R., et al.* Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone // Mar. Drugs. 2015. V. 13. № 12. P. 7314–7338. https://doi.org/10.3390/md13127068

82. *Delmar K., et al.* The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin // Carbohydr. Polym. 2015. V. 127. P. 28–37. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.039

83. *Kildeeva N., et al.* Influence of genipin crosslinking on the properties of chitosan-based films // Polymers (Basel). 2020. V. 12. № 5. P. 1086.
https://doi.org/10.3390/polym12051086

84. *Nikonorov V.V., et al.* Crosslinking in solutions of chitosan in the presence of a crosslinking reagent for production of fibre biocatalysts // Fibre Chem. 2006. V. 38. № 2. P. 95–97.
https://doi.org/10.1007/s10692-006-0047-7

85. *Кильдеева Н.Р. и др.* Структурообразование в растворах хитозана в присутствии сшивающего реагента при получении биологически активных полимерных материалов // Известия высших учебных заведений // Химия и химическая технология. 2007. Т. 50. № 3. С. 53–56.

86. *Frick J.M., et al.* Influence of glutaraldehyde crosslinking and alkaline post-treatment on the properties of chitosan-based films // J. Polym. Environ. 2018. V. 26. № 7. P. 2748–2757.
https://doi.org/10.1007/s10924-017-1166-3

87. *Oliveira A.C.S., et al.* Effect of glutaraldehyde/glycerol ratios on the properties of chitosan films // J. Food Process. Preserv. 2021. V. 45. № 1. P. 15060.
https://doi.org/10.1111/jfpp.15060

88. *Kovaříček P., et al.* Merging constitutional and motional covalent dynamics in reversible imine formation and exchange processes // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. № 22. P. 9446–9455.
https://doi.org/10.1021/ja302793c

89. *Wilson A., et al.* Functional systems with orthogonal dynamic covalent bonds // Chem. Soc. Rev. 2014. V. 43. № 6. P. 1948–1962.
https://doi.org/10.1039/c3cs60342c

90. *Wang L.L., et al.* Three-dimensional extrusion bioprinting of single- and double-network hydrogels containing dynamic covalent crosslinks // J. Biomed. Mater. Res. – Part A. 2018. V. 106. № 4. P. 865–875.
https://doi.org/10.1002/jbm.a.36323

91. *Guo B., et al.* Degradable conductive self-healing hydrogels based on dextran-graft-tetraaniline and N-carboxyethyl chitosan as injectable carriers for myoblast cell therapy and muscle regeneration // Acta Biomater. 2019. V. 84. P. 180–193.
https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.008

92. *Marin L., et al.* Antifungal vanillin-imino-chitosan biodynameric films // J. Mater. Chem. B. 2013. V. 27. № 1. P. 3353–3358.
https://doi.org/10.1039/c3tb20558d

93. *Iftime M.M., et al.* Chitosan crosslinking with a vanillin isomer toward self-healing hydrogels with antifungal activity // Int. J. Biol. Macromol. 2022. V. 205. P. 574–586.
https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.077

94. *Iftime M., et al.* New formulations based on salicyl-imine-chitosan hydrogels for prolonged drug release // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 160. P. 398–408.
https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.207

95. *Ailincai D., et al.* Iminoboronate-chitooligosaccharides hydrogels with strong antimicrobial activity for biomedical applications // Carbohydr. Polym. 2022. V. 276. P. 118727.
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118727

96. *Anisiei A., et al.* Imination of microporous chitosan fibers—A route to biomaterials with “on demand” antimicrobial activity and biodegradation for wound dressings // Pharmaceutics. 2022. V. 14. № 1. P. 117.
https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010117

97. *Marin L., et al.* Development of biocompatible glycodynameric hydrogels joining two natural motifs by dynamic constitutional chemistry // Carbohydr. Polym. 2017. V. 170. P. 60–71.
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.055

98. *Chen H., et al.* One-step dynamic imine chemistry for preparation of chitosan-stabilized emulsions using a natural aldehyde: acid trigger mechanism and regulation and gastric delivery // J. Agric. Food Chem. 2020. V. 68. № 19. P. 5412–5425.
https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08301

99. *Jagadish R.S., et al.* Preparation of N-vanillyl chitosan and 4-hydroxybenzyl chitosan and their physico-mechanical, optical, barrier, and antimicrobial properties // Carbohydr. Polym. 2012. V. 87. № 1. P. 110–116.
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.024

100. *Marin L., et al.* Imino-chitosan biopolymeric films. Obtaining, self-assembling, surface and antimicrobial properties // Carbohydr. Polym. 2015. V. 117. P. 762–770. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.050

101. *Arya S.S., et al.* Vanillin : A review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule // Adv. Tradit. Med. 2021. V. 21. P. 1–17. https://doi.org/10.1007/s13596-020-00531-w

102. *Marin L., et al.* Imino-chitosan biodynamers // Chem. Commun. 2012. V. 48. № 70. P. 8778–8780. https://doi.org/10.1039/c2cc34337a

103. *Xu C., et al.* Self-healing chitosan/vanillin hydrogels based on Schiff-base bond/hydrogen bond hybrid linkages // Polym. Test. 2018. V. 66. P. 155–163. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.01.016

104. *Iftime M.M., et al.* Salicyl-imine-chitosan hydrogels: Supramolecular architecturing as a crosslinking method toward multifunctional hydrogels // Carbohydr. Polym. 2017. V. 165. P. 39–50. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.027

105. *Liu C., et al.* Multiple chiroptical switches and logic circuit based on salicyl– imine–chitosan hydrogel // Carbohydr. Polym. 2021. V. 257. P. 117534. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117534

106. *Ailincai D., et al.* Hydrogels based on imino-chitosan amphiphiles as a matrix for drug delivery systems // Polymers (Basel). 2020. V. 12. № 11. P. 2687. https://doi.org/10.3390/polym12112687

107. *Hu J., et al.* Vanillin-bioglass cross-linked 3D porous chitosan scaffolds with strong osteopromotive and antibacterial abilities for bone tissue engineering // Carbohydr. Polym. 2021. V. 271. P. 118440. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118440

108. *Hunger M., et al.* Double crosslinking of chitosan/vanillin hydrogels as a basis for mechanically strong gradient scaffolds for tissue engineering // Eng. Biomater. 2020. V. 155. P. 2–11. https://doi.org/10.34821/eng.biomat.155.2020.2-11

109. *Zhang Z.H., et al.* Enhancing mechanical properties of chitosan films via modification with vanillin // Int. J. Biol. Macromol. 2015. V. 81. P. 638–643. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.042

110. *Damiri F., et al.* Synthesis and characterization of lyophilized chitosan-based hydrogels cross-linked with benzaldehyde for controlled drug release // J. Chem. 2020. V. 2020. P. 8747639. https://doi.org/10.1155/2020/8747639

111. *Qu J., et al.* pH-responsive self-healing injectable hydrogel based on N-carboxyethyl chitosan for hepatocellular carcinoma therapy // Acta Biomater. 2017. V. 58. P. 168–180. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.001

112. *Bratskaya S., et al.* Carboxyalkylchitosan-based hydrogels with “imine clip”: enhanced stability and amino acids-induced disassembly under physiological conditions // Carbohydr. Polym. 2021. V. 274. P. 118618. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118618

113. *Ding C., et al.* Dually responsive injectable hydrogel prepared by in situ cross-linking of glycol chitosan and benzaldehyde-capped PEO-PPO-PEO // Biomacromolecules. 2010. V. 11. № 4. P. 1043–1051. https://doi.org/10.1021/bm1000179

114. *Bratskaya S., et al.* Stimuli-responsive dual cross-linked N-carboxyethylchitosan hydrogels with tunable dissolution rate // Gels. 2021. V. 7. № 4. P. 188. https://doi.org/10.3390/gels7040188

115. *Qu X., Yang Z.* Benzoic-imine-based physiological-pH-responsive materials for biomedical applications // Chemistry – An Asian Journal. 2016. V. 11. № 19. P. 2633–2641. https://doi.org/10.1002/asia.201600452

116. *Andreica B.-I., et al.* Biocompatible hydrogels based on quaternary ammonium salts of chitosan with high antimicrobial activity as biocidal agents for disinfection // Carbohydr. Polym. 2024. V. 342. P. 122389. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122389

117. *Skatova A.V., et al.* Hydrogels of N-(2-carboxyethyl)chitosan with vanillin // Polym. Sci. Ser. B. 2022. V. 64. № 5. P. 699–706. https://doi.org/10.1134/S1560090422700361

118. *Bhattarai N., et al.* PEG-grafted chitosan as an injectable thermoreversible hydrogel // Macromol. Biosci. 2005. V. 5. № 2. P. 107–111.
https://doi.org/10.1002/mabi.200400140

119. *Vijayan A., et al.* PEG grafted chitosan scaffold for dual growth factor delivery for enhanced wound healing // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 19165.
https://doi.org/10.1038/s41598-019-55214-7

120. *De Boulle K., et al.* A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers // Dermatologic Surg. 2013. V. 39. № 12. P. 1758–1766.
https://doi.org/10.1111/dsu.12301

121. *Lei Y., et al.* Hybrid pericardium with VEGF-loaded hyaluronic acid hydrogel coating to improve the biological properties of bioprosthetic heart valves // Macromol. Biosci. 2019. V. 19. № 6. P. 1800390.
https://doi.org/10.1002/mabi.201800390

122. *Hendriks M., et al.* Bioprostheses and its alternative fixation // J. Long. Term. Eff. Med. Implants. 2017. V. 27. № 2–4. P. 125–142.
https://doi.org/10.1615/JLongTermEffMedImplants.v27.i2-4.40

123. *Wende F.J., et al.* Insights on the reactivity of chondroitin and hyaluronan toward 1,4-butanediol diglycidyl ether // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 131. P. 812–820.
https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.020

124. *Xue Y., et al.* Synthesis of hyaluronic acid hydrogels by crosslinking the mixture of high-molecular-weight hyaluronic acid and low-molecular-weight hyaluronic acid with 1,4-butanediol diglycidyl ether // RSC Advances. 2020. V. 10. № 12. P. 7206–7213.
https://doi.org/10.1039/c9ra09271d

125. *Gámiz González M.A., et al.* Synthesis of highly swellable hydrogels of water-soluble carboxymethyl chitosan and poly(ethylene glycol) // Polym. Int. 2017. V. 66. № 11. P. 1624–1632.
https://doi.org/10.1002/pi.5424

126. *Tripodo G., et al.* Hydrogels for biomedical applications from glycol chitosan and PEG diglycidyl ether exhibit pro-angiogenic and antibacterial activity // Carbohydr. Polym. 2018. V. 198. P. 124–130.
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.061

127. *Balasubramani K.P., et al.* Mechanism and kinetics of curing of diglycidyl ether of bisphenol a (DGEBA) resin by chitosan // Polym. Eng. Sci. 2016. V. 57. № 8. P. 865–874.
https://doi.org/10.1002/pen.24463

128. *Kiuchi H., et al.* Preparation and characterization of poly(ethylene glycol) crosslinked chitosan films // J. Appl. Polym. Sci. 2008. V. 107. № 6. P. 2823–3830.
https://doi.org/10.1002/app.27546

129. *Liu R., et al.* Solution blowing of chitosan/PVA hydrogel nanofiber mats // Carbohydr. Polym. 2014. V. 101. P. 1116–1121.
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.056

130. *Shechter L., et al.* Glycidyl ether reactions with alcohols, phenols, carboxylic acids, and acid anhydrides // Ind. Eng. Chem. 1956. V. 48. № 1. P. 86–93.
https://doi.org/10.1021/ie50553a028

131. *Privar Y., et al.* Gelation and cryogelation of chitosan: Origin of low efficiency of diglycidyl ethers as cross-linkers in acetic acid solutions // Polysaccharides. 2024. V. 5. № 4. P. 731–742.
https://doi.org/10.3390/polysaccharides5040046

132. *Shechter L., et al.* Glycidyl ether reactions with amines // Ind. Eng. Chem. 1956. V. 48. № 1. P. 94–97.
https://doi.org/10.1021/ie50553a029

133. *Privar Y., et al.* Tuning mechanical properties, swelling, and enzymatic degradation of chitosan cryogels using diglycidyl ethers of glycols with different chain length as cross-linkers // Gels. 2024. V. 10. № 7. P. 483.
https://doi.org/10.3390/gels10070483

134. *Boroda A., et al.* Sponge-like scaffolds for colorectal cancer 3D models: Substrate-driven difference in micro-tumors morphology // Biomimetics. 2022. V. 7. № 2. P. 56.
https://doi.org/10.3390/biomimetics7020056

135. *Gun'ko V.M., et al.* Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation // Adv. Colloid Interface Sci. 2013. V. 187–188. P. 1–46.
https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.11.001

136. *Sen T., et al.* Hierarchical porous hybrid chitosan scaffolds with tailorable mechanical properties // Mater. Lett. 2017. V. 209. P. 528–531. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.08.088

137. *Kil'deeva N.R., et al.* Modification of chitosan cryogels by pyridoxal phosphate to improve sorption capacity // Fibre Chem. 2012. V. 43. № 6. P. 426–432. https://doi.org/10.1007/s10692-012-9377-9

138. *Savina I.N., et al.* Design and assessment of biodegradable macroporous cryogels as advanced tissue engineering and drug carrying materials // Gels. 2021. V. 7. № 3. P. 79. https://doi.org/10.3390/gels7030079

139. *Ng V.W.L., et al.* Antimicrobial hydrogels: A new weapon in the arsenal against multidrug-resistant infections // Adv. Drug Deliv. Rev. 2014. V. 78. P. 46–62. https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.028

140. *Shen X., et al.* Hydrogels based on cellulose and chitin: Fabrication, properties, and applications // Green Chem. 2015. V. 18. № 1. P. 53–75. https://doi.org/10.1039/c5gc02396c

141. *Yang W.Y., Thirumavalavan M., Lee J.F.* Effects of porogen and cross-linking agents on improved properties of silica-supported macroporous chitosan membranes for enzyme immobilization // J. Membr. Biol. 2015. V. 248. № 2. P. 231–240. https://doi.org/10.1007/s00232-014-9763-8

142. *Bhattarai N., Gunn J., Zhang M.* Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. 2010. V. 62. № 1. P. 83–99. https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019

143. *Andrabi S.M., et al.* Supermacroporous hybrid polymeric cryogels for efficient removal of metallic contaminants and microbes from water // Int. J. Polym. Mater. 2016. V. 65. № 12. P. 636–645. https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1157795

144. *Hedström M., et al.* Monolithic macroporous albumin / chitosan cryogel structure : A new matrix for enzyme immobilization // Anal Bioanal Chem. 2008. V. 390. P. 907–912. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1745-6

145. *Sun S., et al.* Preparation of agarose/chitosan composite supermacroporous monolithic cryogels for affinity purification of glycoproteins // J. Sep. Sci. 2012. V. 35. № 7. P. 893–900. https://doi.org/10.1002/jssc.201100940

146. *Takeshita S., et al.* Chemistry of chitosan aerogels: Three-dimensional pore control for tailored applications // Angew. Chemie – Int. Ed. 2021. V. 60. № 18. P. 9828–9851. https://doi.org/10.1002/anie.202003053

147. *Sampaio G.Y.H., et al.* Biodegradable chitosan scaffolds: Effect of genipin crosslinking // Mater. Sci. Forum. 2014. V. 805. P. 116–121. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.805.116

148. *Seol Y.J., et al.* Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation // Biotechnol. Lett. 2004. V. 26. № 13. P. 1037–1041. https://doi.org/10.1023/b:bile.0000032962.79531.fd

149. *Auriemma F., et al.* Polymeric cryogels // In: Advances in Polymer Science / ed. Okay O. 2014. V. 263. P. 49–102. ISBN 978-3-319-05845-0

150. *Plieva F.M., et al.* Pore structure of macroporous monolithic cryogels prepared from poly(vinyl alcohol) // J. Appl. Polym. Sci. 2006. V. 100. № 2. P. 1057–1066. https://doi.org/10.1002/app.23200

151. *Лозинский В.И.* Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения // Успехи химии. 2002. Т. 71. № 6. С. 489–511. https://doi.org/10.1070/RC2002v071n06ABEH000720

152. *Lozinsky V.I., et al.* Basic Principles of Cryotropic Gelation. 2014. ISBN 9783319058467

153. *Wartenberg A., et al.* Glycosaminoglycan-based cryogels as scaffolds for cell cultivation and tissue regeneration // Molecules. 2021. V. 26. № 18. P. 5597. https://doi.org/10.3390/molecules26185597

154. *Bakhshpour M., et al.* Biomedical applications of polymeric cryogels // Appl. Sci. 2019. V. 9. № 3. P. 553. https://doi.org/10.3390/app9030553

155. *Nikonorov V.V., et al.* Synthesis and characteristics of cryogels of chitosan crosslinked by glutaric aldehyde // Polym. Sci. Ser. A. 2010. V. 52. № 8. P. 828–834. https://doi.org/10.1134/S0965545X10080092

156. *Zhang H., et al.* Control of ice crystal growth and its effect on porous structure of chitosan cryogels // Chem. Eng. Sci. 2019. V. 201. P. 50–57. https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.02.026

157. *Nikonorov V.V., et al.* Effect of polymer-precursor molecular mass on the formation and properties of covalently crosslinked chitosan cryogels // Polym. Sci. Ser. A. 2011. V. 53. № 12. P. 1150–1158. https://doi.org/10.1134/S0965545X1112011X

158. *Veleshko I.E., et al.* Sorption of Eu(III) from solutions of covalently cross-linked chitosan cryogels // Fibre Chem. 2011. V. 42. № 6. P. 364–369. https://doi.org/10.1007/s10692-011-9287-2

159. *Bhat S., et al.* Supermacroprous chitosan–agarose–gelatin cryogels: *in vitro* characterization and *in vivo* assessment for cartilage tissue engineering // J. R. Soc. Interface. 2011. V. 8. № 57. P. 540–554. https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0455

160. *Bhat S., et al.* Cell proliferation on three-dimensional chitosan–agarose–gelatin cryogel scaffolds for tissue engineering applications // J. Biosci. Bioeng. 2012. V. 114. № 6. P. 663–670. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.07.005

161. *Roberts G.A.F., Taylor K.E.* Chitosan gels. 3. The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde // Macromol. Chem. 1989. V. 190. № 5. P. 951–960. https://doi.org/10.1002/macp.1989.021900504

162. *Henderson T.M.A., et al.* Cryogels for biomedical applications // J. Mater. Chem. B. 2013. V. 1. № 21. P. 2682–2695. https://doi.org/10.1039/c3tb20280a

163. *Privar Y., et al.*. Removal of Alizarin Red by supermacroporous cross-linked chitosan monolith sorbents // Prog. Chem. Appl. Chitin its Deriv. 2019. V. XXIV. P. 164–171. https://doi.org/10.15259/PCACD.24.015

164. *Kang Y., et al.* 3D Bioprinting of tumor models for cancer research // ACS Appl. Bio Mater. 2020. V. 3. № 9. P. 5552–5573. https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00791

165. *Kumar A., et al.* Integrated bioprocess for the production and isolation of urokinase from animal cell culture using supermacroporous cryogel matrices // Biotechnol. Bioeng. 2006. V. 93. № 4. P. 636–646. https://doi.org/10.1002/bit.20719

166. *Fang J.Y., et al.* Tumor bioengineering using a transglutaminase crosslinked hydrogel // PLoS One. 2014. V. 9. № 8. P. e105616. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105616

167. *Lim S.M., et al. In vitro* and *in vivo* degradation behavior of acetylated chitosan porous beads // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2008. V. 19. № 4. P. 453–466. https://doi.org/10.1163/156856208783719482

168. *Islam N., et al.* Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery // Heliyon. 2019. V. 5. № 5. P. e01684. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01684

169. *Tanuma H., et al.* Preparation and characterization of PEG-cross-linked chitosan hydrogel films with controllable swelling and enzymatic degradation behavior // Carbohydr. Polym. 2010. V. 80. № 1. P. 260–265. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.022