

DOI: 10.7868/S3034574X26020037
УДК 555.66

Оригинальная статья

МАКРОПОРИСТЫЙ КРИОСТРУКТУРИРОВАННЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ СШИТОГО ВАНИЛИНОМ ХИТОЗАНА И ЕГО МЕХАНИЧЕСКИЕ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ, САНИТАРНО-ХИМИЧЕСКИЕ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

М. Делич^{1*}, К.Л. Колосов², И.А. Буторова¹, И.Г. Андропова¹, Е.А. Подорожко³,
Н.Е. Беняев², А.А. Артюхов^{1,3}, А.Н. Кусков¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Российская Федерация

² ООО «Национальный научный центр токсикологической и биологической безопасности медицинских изделий», Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Российская Федерация

*E-mail: delicmasa2001@gmail.com

Аннотация. В работе предложен метод получения макропористого криоструктурированного гидрогелевого материала на основе хитозана, сшитого малотоксичным агентом природного происхождения — ванилином, что позволяет снизить потенциальные риски токсичности по сравнению с традиционными синтетическими сшивателями (например, глутаровым альдегидом). Метод включает двухстадийный процесс: криоструктурирование с последующей лиофильной сушкой для формирования первичной пористой архитектуры и термическое сшивание, приводящее к образованию динамических ковалентных связей — оснований Шиффа. Полученный материал характеризовался развитой системой взаимосвязанных пор со средним размером около 60 мкм, что способствует капиллярному транспорту жидкостей, высокой скоростью набухания и характерными механическими свойствами (эластичностью и прочностью), определяемыми его однородной пористой структурой. Продемонстрирована избирательная антибактериальная активность материала в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* (степень ингибирования роста составила 24,3 %), а также проведена его санитарно-химическая оценка, подтвердившая отсутствие токсичных выделений. Установлено, что материал сохранял свои ключевые физико-механические и санитарно-химические свойства после финишной стерилизации ионизирующим излучением в дозах до 25 кГр, что является стандартным требованием для медицинских изделий. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработанного биосовместимого материала для использования в качестве основы для изделий медицинского назначения, таких как раневые покрытия с сорбционными свойствами, гемостатические губки для остановки кровотечений и имплантаты для тканевой инженерии.

Ключевые слова: хитозан, гидрогель, пористость, криоструктурирование, антибактериальная активность

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-00276-25-00 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Соблюдение этических стандартов. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

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

Ссылка для цитирования: Делич М., Колосов К.Л., Буторова И.А., Андропова И.Г., Подорожко Е.А., Беняев Н.Е., Артюхов А.А., Кусков А.Н. Макропористый криоструктурированный материал на основе сшитого ванилином хитозана и его механические, физико-химические, санитарно-химические и антибактериальные свойства. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 2. С. 169–182. <https://doi.org/10.7868/S3034574X26020037>

MACROPOROUS CRYO-STRUCTURED MATERIAL BASED ON VANILLIN-CROSS-LINKED CHITOSAN AND ITS MECHANICAL, PHYSICOCHEMICAL, SANITARY-CHEMICAL AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES

M. Delich^{1*}, K.L. Kolosov², I.A. Butorova¹, I.G. Andropova¹, E.A. Podorozhko³,
N.E. Benyaev², A.A. Artyukhov^{1,3}, A.N. Kuskov¹

¹*D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation*

²*National Scientific Center for Toxicological and Biological Safety of Medical Devices Ltd, Moscow, Russian Federation*

³*A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

**E-mail: delicmasa2001@gmail.com*

Abstract. The paper proposes a method for producing a macroporous cryostructured hydrogel material based on chitosan crosslinked with a low-toxic agent of natural origin, vanillin, which reduces the potential risks of toxicity compared with traditional synthetic crosslinkers (for example, glutaraldehyde). The method includes a two-stage process: cryostructuring followed by freeze-drying to form a primary porous architecture and thermal crosslinking leading to the formation of dynamic covalent bonds — Schiff bases. The resulting material was characterized by a developed system of interconnected pores with an average size of about 60 microns, which promotes capillary transport of liquids, high swelling rate and characteristic mechanical properties (elasticity and strength) determined by its homogeneous porous structure. The selective antibacterial activity of the material against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* was demonstrated (the degree of growth inhibition was 24.3 %), and its sanitary and chemical assessment was carried out, confirming the absence of toxic secretions. It was found that the material retained its key physico-mechanical and sanitary-chemical properties after final sterilization with ionizing radiation in doses up to 25 kGy, which is a standard requirement for medical devices. The results obtained indicate the prospects of the developed biocompatible material for use as a base for medical devices, such as wound coatings with sorption properties, hemostatic sponges for stopping bleeding, and implants for tissue engineering.

Keywords: chitosan, hydrogel, porosity, cryostructuration, antibacterial activity

Funding. The work was carried out within the framework of State Assignment No. 075-00276-25-00 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Ethics declarations. This work does not contain any human or animal studies.

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

For Citation: Delich M., Kolosov K.L., Butorova I.A., Andropova I.G., Podorozhko E.A., Benyaev N.E., Artyukhov A.A., Kuskov A.N. Macroporous cryo-structured material based on vanillin-cross-linked chitosan and its mechanical, physicochemical, sanitary-chemical and antibacterial properties. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(2):169–182. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S3034574X26020037>

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых полимерных материалов медико-биологического назначения является ключевым направлением в совершенствовании современных технологий в области здравоохранения. Такие материалы, характеризующиеся биосовместимостью, многофункциональностью и предназначенные для контакта со средой живого организма, играют важную роль в создании инновационных медицинских продуктов. Благодаря возможности целенаправленной модификации их функциональных свойств, они находят применение в широком спектре областей — от систем доставки лекарственных средств до матриц для тканевой инженерии. Подобная универсальность открывает значительные перспективы для повышения эффективности терапевтических вмешательств и улучшения клинических результатов.

Все более пристальное внимание в качестве основы для подобных материалов привлекает биополимер хитозан. Повышенный интерес к нему связан с уникальным комплексом физико-химических свойств, широким спектром биологической активности, биосовместимостью, низкой токсичностью и доступностью возобновляемого сырья [1].

Материалы на основе хитозана в различных формах (аэрогели, гидрогели, пленки, волокна и др.) в настоящее время уже достаточно активно используются в биомедицинской практике [2–5]. Особый интерес для биомедицины представляют высокопористые композиции — макропористые гидрогели и аэрогели, имеющие перспективы в качестве сорбентов и носителей лекарственных препаратов, антимикробных агентов, раневых покрытий, местных гемостатиков [6, 7].

Макропористые гидрогели обладают рядом ключевых преимуществ по сравнению с «традиционными» гидрогелями. Благодаря иерархической макропористой структуре, материалы на их основе способны обеспечивать высокую скорость набухания и эффективное поглощение физиологических жидкостей и экссудата, что критически важно, в частности, для раневых покрытий и гемостатических материалов [8, 9]. Помимо этого, подобная структура при имплантации материала способствует лучшей миграции клеток внутрь объема имплантата и васкуляризации, ускоряя тем самым репарационные процессы в области тканевого дефекта [8]. В отличие от «обычных» монолитных гидрогелей, макропористые гидрогели демонстрируют улучшенные механические свойства и стабильность при циклических нагрузках, что немаловажно для применения в условиях динамичных биологических сред [9, 10]. Также макропористая архитектура позволяет эффективно инкапсулировать и контролируемо высвобождать широкий спектр биологически активных веществ — антибиотиков, факторов роста и противовос-

палительных агентов, усиливая терапевтический эффект при применении медицинских изделий [8, 11].

На сегодняшний день разработан целый ряд методов создания подобных пористых систем. Наиболее распространенными среди них являются:

- сублимационная сушка полимерных гидрогелей после их набухания в воде [12];

- полимеризация в присутствии компонентов, способных выделять в процессе реакции газ (CO_2 , N_2) [13, 14];

- полимеризация в присутствии компонентов, которые растворимы в мономере, но не растворяются в образующемся полимере [15–16];

- формирование пространственной полимерной матрицы гидрогеля в присутствии гетерофазы замороженного растворителя (вода, формамид) [17];

- полимеризация в присутствии растворимого компонента (глюкоза, сахароза, NaCl), который может быть вымыт после завершения процесса [18–19].

Каждый из перечисленных методов имеет как преимущества, так и ряд недостатков, ограничивающих их применимость. Однако, по мнению многих исследователей, в настоящее время наиболее перспективным методом получения макропористых гидрогелевых материалов медико-биологического назначения является формирование трехмерной полимерной матрицы в условиях криоструктурирования, в присутствии гетерофазы замороженного растворителя (воды) [20]. Несмотря на сравнительную простоту, данный метод отличается гибкостью и позволяет варьировать свойства получаемых гидрогелей в широком интервале, обеспечивая получение материалов с оптимальными для каждой конкретной области применения характеристиками.

Химическая активность хитозана обусловлена наличием amino- и гидроксильных групп в его структуре, что делает его перспективным для применения в биосенсорике, антимикробной обработке ран, биовизуализации, доставке генетического материала и лекарственных веществ, а также в качестве покрытия для медицинских имплантатов [21]. Медицинские изделия на его основе активно исследуются в контексте разработки систем доставки для контролируемого высвобождения активных компонентов и стабилизации биологически активных молекул, таких как белки, пептиды и нуклеиновые кислоты [22].

При разработке биоматериалов для медицинского применения значительное внимание уделяется их микробиологической безопасности. Наличие у материала собственной антимикробной активности может существенно повысить эффективность изделий на его основе в ряде клинических сценариев, например, при лечении инфицированных ран. Именно этот фактор объясняет повышенное

внимание исследователей и разработчиков к хитозану и его производным, обладающим выраженной антимикробной активностью [23–27].

Таким образом, несмотря на широкую изученность хитозана и методов криогенного структурирования, комбинация получения макропористого каркаса при замораживании системы и последующем его сшивании малотоксичным ванилином, с комплексной оценкой механических, антибактериальных свойств и стабильности материала, представляет значительный интерес и является малоизученной областью. Использование ванилина в качестве сшивающего агента позволяет избежать проблем, связанных с токсичностью традиционных сшивателей (таких как глутаровый альдегид или эпихлоргидрин), что критически важно для создания биосовместимых материалов медицинского назначения.

Цель настоящей работы — получение методом криоструктурирования макропористого материала на основе хитозана с последующей сшивкой с использованием малотоксичного сшивающего агента (ванилина), а также изучение его практически значимых для медицинских изделий свойств — набухаемости, антибактериальной активности, санитарно-химической чистоты и устойчивости к воздействию стерилизующих доз ионизирующего излучения.

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие материалы и реактивы: хитозан пищевой кислоторастворимый (степень деацетилирования, СД, 97 %, молекулярная масса ~200 кДа, ООО «Биопрогресс», Россия); ванилин (Thermo Fisher Scientific, США); кислота уксусная («Реахим», Россия), агар-агар бактериологический (сила геля более 800 г/см², «Диаэм», Россия); пептон сухой ферментативный (ГОСТ 13805-75), агаризованная питательная среда №8 ГРМ ТУ 9398-008-78095326-2007 (ГНЦ ПМБ, Россия). Другие материалы и растворители квалификации «хч» и «чда» («Русхим», Россия) использовали без дополнительной очистки.

Штаммы *Staphylococcus aureus* FDA-209P и *Staphylococcus epidermidis* ВКПМ-В-12635 получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» (Россия). Штаммы поддерживали и размножали в пробирках на скошенной 2% агаризованной питательной среде №8 ГРМ. Культивирование штаммов осуществляли в термостате при температуре 32 ± 2 °С в течение 24 ч.

Получение макропористого гидрогелевого материала на основе хитозана. Пористый сшитый материал получали по методике, включающей криоструктурирование реакционной системы с последующей термической сшивкой. В качестве исходного поли-

мера использовали высокомолекулярный хитозан с ММ около 200 кДа. Вначале готовили 2%-ный раствор хитозана в 1%-ном водном растворе уксусной кислоты путем перемешивания системы на магнитной мешалке IKA RCT basic (IKA-Werke GmbH & Co., Германия) в течение 2 ч при температуре 80 °С до получения гомогенного раствора. Полученный раствор охлаждали до комнатной температуры и диализовали против дистиллированной воды (диализные мешки, Thermo Fisher Scientific, США, с отсечкой по молекулярным массам 6 кДа) до значения рН раствора 5,4–5,6. В очищенный таким образом от уксусной кислоты раствор при температуре 80 °С и постоянном перемешивании (500 об./мин) вносили 3-метокси-4-гидроксибензальдегид (ванилин) в массовом соотношении хитозан : ванилин 2:1 с последующим перемешиванием в течение 30 мин до полного растворения ванилина.

Полученную гомогенную систему разливали в стеклянные формы и замораживали при -18 °С в морозильной камере Beko RCNK 270E20 (Beko PLC, Турция) в течение 24 ч. Затем замороженные образцы высушивали в лиофильной сушилке Martin Christ Beta 1-8 LDplus (Martin Christ GmbH, Германия) 96 ч для получения нековалентно стабилизированного пористого каркаса. Заключительный этап химического сшивания проводили путем термической обработки лиофилизированных образцов в сушильном шкафу SNOL 58/350 (UAB “Snol”, Литва) при температуре 90 °С в течение 3 ч, что обеспечивало образование поперечных связей между аминокруппами хитозана и альдегидными группами ванилина. Конечный продукт представлял собой легкий механически стабильный пористый материал, который хранили в эксикаторе до дальнейших исследований.

Изучение равновесной набухаемости образцов. Влагопоглощение макропористого материала изучали гравиметрическим методом в дистиллированной воде (ГОСТ Р 56762–2015). Результаты оценивали по величине влагопоглощения М (г/г), которое рассчитывали по формуле (1):

$$M = \frac{m_i - m_0}{m_0}, \quad (1)$$

где m_i — текущее значение массы образца, г; m_0 — масса сухого образца, г.

Изучение морфологии поверхности образцов. Морфологию поверхности образцов материала в набухом состоянии изучали при помощи оптической микроскопии (оптический микроскоп Nikon SM Z100, снабженный цифровой камерой).

Обработку полученных микрофотографий и оценку размера наблюдаемых пор проводили при помощи программного комплекса TopView 4.12. Диаметр эквивалентной сферы определяли согласно выражению:

$$d_{\text{э}} = \sqrt{a \cdot b}, \quad (2)$$

где a, b — радиусы эллипса с площадью поры.

Проводилась обработка не менее трех микрофотографий для каждого образца. Количество обработанных пор на каждой микрофотографии было не менее 100. По результатам, в соответствии с принятой методикой, строили гистограммы распределения пор по размерам.

Средний диаметр пор определяли по формуле:

$$d_{\text{ср}} = \frac{\sum_{i=0}^N d_{\text{э},i}}{N}, \quad (3)$$

где $d_{\text{э},i}$ — эквивалентный диаметр поры; N — общее число пор.

Изучение механических свойств образцов. Измерения проводили для образцов цилиндрической формы (диаметр ~20 мм, высота ~30 мм). Перед измерением образцы помещали в дистиллированную воду для набухания.

Компрессионные модули Юнга образцов, полностью погруженных в воду, определяли с помощью автоматического анализатора текстуры TA-Plus (Lloyd Instruments Ltd., Великобритания) из прямолинейных участков зависимости кривой напряжения при скорости одноосного приложения нагрузки 0,5 мм/мин. Измерения проводили до достижения 30- и 80-процентной деформации образца. Модули упругости определяли минимум для трех параллельных образцов, полученные результаты усредняли.

Оценка антимикробной активности. Антимикробную активность материала оценивали по степени ингибирования роста тест-штаммов в присутствии материала (*Staphylococcus aureus* FDA-209P и *Staphylococcus epidermidis* ВКПМ-В-12635) в жидкой питательной среде № 8 ГРМ по сравнению с контролем. В качестве контроля оценивали рост тест-штаммов в жидкой питательной среде № 8 ГРМ без внесения в среду материала.

Для исследований использовали готовую сухую питательную среду № 8 ГРМ ТУ 9398-008-78095326-2007, ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболensk, Россия).

Рост клеток тест-штаммов *Staphylococcus aureus* FDA-209P и *Staphylococcus epidermidis* ВКПМ-В-12635 в жидкой питательной среде определяли спектрофотометрическим методом по величине оптической плотности бактериальной суспензии [28]. Измерения проводили на спектрофотометре UNICO 1200 (Unico, США) при $\lambda = 600$ нм в кюветах с длиной светового пути 10 мм.

Степень ингибирования роста тест-штаммов в присутствии материала после 24-часовой инкубации рассчитывали по формуле (4):

$$\text{степень ингибирования} = \frac{(D_{\text{к}} - D_{\text{о}}) \times 100}{D_{\text{к}}}, \quad (4)$$

где $D_{\text{к}}$ — значение оптической плотности бактериальной суспензии в контроле, $D_{\text{о}}$ — значение оптической плотности бактериальной суспензии в присутствии материала.

Стерилизация образцов. Стерилизацию материала проводили на установке с рентгеновской трубкой 5БХВ6-W с неполной защитой от неиспользуемого рентгеновского излучения, с одним рабочим пучком излучения. Мощность дозы по дозиметру Фрикке равнялась 3 Гр/с. Рабочие параметры трубки: сила тока $I = 50$ мА и напряжение $U = 40$ кВ. Облучение в дозе 12 кГр и 25кГр проведено при времени воздействия рентген-лучей 33,3 минуты. Доза рассчитывалась как время облучения (с) х мощность поглощенной дозы [29, 30].

Проверку на стерильность образцов проводили в соответствии с ОФС 1.2.4.003.15 Стерильность ГФ РФ XIV.

Санитарно-химические исследования. Исследования были направлены на выявление химических соединений, способных мигрировать из материала изделия в модельные среды, включая потенциально токсичные примеси, остаточные реагенты и добавки. В ходе работы было проведено определение pH водной вытяжки по ГОСТ 31209-2003; определение показателя ультрафиолетового поглощения по ГОСТ 31209-2003; определение показателя восстановительных примесей по ГОСТ 31209-2003; определение содержания тяжелых элементов методом атомно-абсорбционной спектроскопии по ГОСТ 31870-2012; фотометрическое определение содержания формальдегида по ГОСТ Р 55227-2012; фотометрическое определение содержания бора по РД 52.24.389-2011; определение содержания элементов методом инверсионной вольтамперометрии по ГОСТ 31866-2012; определение летучих органических соединений по МУК 4.1.3166-14.

Статистическая обработка. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали методы описательной статистики с помощью программы Microsoft Excel (пакет Microsoft Office 2016). Результаты представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (SD). Для оценки достоверности различий между группами применяли t -критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Объем выборки (n) для каждого эксперимента составлял не менее 3 независимых повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе для получения материала на основе хитозана была использована распространенная схема формирования криоструктурированных полимерных материалов [20], заключающаяся в двухстадийном процессе, на первом этапе

которого посредством криогенной обработки и сублимационной сушки формируется трехмерный макропористый каркас материала (криоструктурат), а на втором этапе проводится фиксация структуры за счет химической сшивки полимерного материала.

Для проведения этих двух этапов готовили и очищали раствор хитозана, к которому добавляли сшивающий агент — ванилин. В отличие от используемых в основном для сшивки хитозана диальдегидов или эпихлоргидрина [31], ванилин является малотоксичным соединением, что исключительно важно при получении материалов медико-биологического назначения. Значительным ограничением, не позволяющим в широких пределах варьировать концентрацию реакционной системы, является ограниченная растворимость ванилина в воде при комнатной и пониженных температурах, а также его сравнительно малая реакционная способность. Эти особенности требуют использования значительных относительно сшиваемого хитозана количеств ванилина для формирования нерастворимых структур, характеризующихся приемлемой механической прочностью. В серии предварительных экспериментов было установлено, что максимально возможная концентрация хитозана в реакционной системе при минимально необходимом массовом соотношении хитозан/ванилин 1 : 2 не превышала 2 % по массе. Поскольку механическая прочность формируемого материала находилась в прямой зависимости от концентрации полимера, именно эти предельные концентрация и соотношение реагентов и использовались для получения исследованных в работе образцов макропористых материалов.

Стоит отдельно отметить, что при таких концентрациях реагентов, даже несмотря на то, что при растворении ванилина использовалось нагревание раствора до 80 °С, в растворе не происходило формирования наблюдаемых визуально сшитых структур. Иными словами, можно утверждать, что трехмерная сшитая полимерная сетка формирова-

лась лишь на финальной стадии фиксации структуры сублимированного криоструктурата, для получения которого раствор полимера, содержащий сшивающий агент, замораживали при температуре минус 18 °С и сушили сублимационно.

Структуру полученного криоструктурата фиксировали нагревом до 90 °С в течение 3 ч (сушильный шкаф SNOL 58/350, UAB, “Snol”, Литва). При этом происходила химическая сшивка макромолекулярных цепей полимера ванилином за счет образования оснований Шиффа (рис. 1).

Общая схема получения макропористого материала представлена на рис. 2.

Важной характеристикой материалов, контактирующих с внутренними средами живых организмов, является морфология их поверхности и, в частности, их пористость. На сегодняшний день наличие в материале системы связанных между собой пор считается необходимым условием для обеспечения эффективного роста, миграции и питания клеток. Помимо наличия сообщения между порами материала большое значение имеет и их размер. Например, недостаточно крупный размер пор снижает миграцию клеток, в конечном итоге приводя к формированию клеточной капсулы вокруг имплантированного материала или изделия на его основе. Это, в конечном итоге, снижает диффузию к клеткам, находящимся в объеме имплантата, питательных веществ и удаление продуктов их жизнедеятельности. С другой стороны, избыточный объем пор ведет к малой площади внутренней поверхности, ограничивая тем самым возможность клеточной адгезии. В настоящее время, из литературных данных, оптимальными для использования в тканевой инженерии считаются матриксы с размером пор от 20 до 1500 мкм. Для материалов, используемых для регенерации кожи и лечения ран в качестве оптимального, обеспечивающего достаточные клеточную активность и жизнеспособность, называется размер пор, лежащий в интервале от 20 до 120 мкм [32].

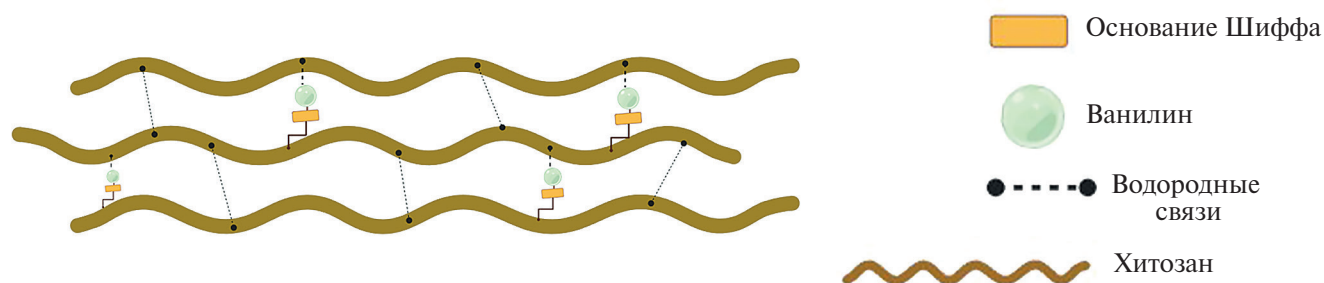


Рис. 1. Схема поперечного сшивания цепей хитозана ванилином с образованием основания Шиффа

Fig. 1. Scheme of cross-linking of chitosan chains with vanillin to form a Schiff base

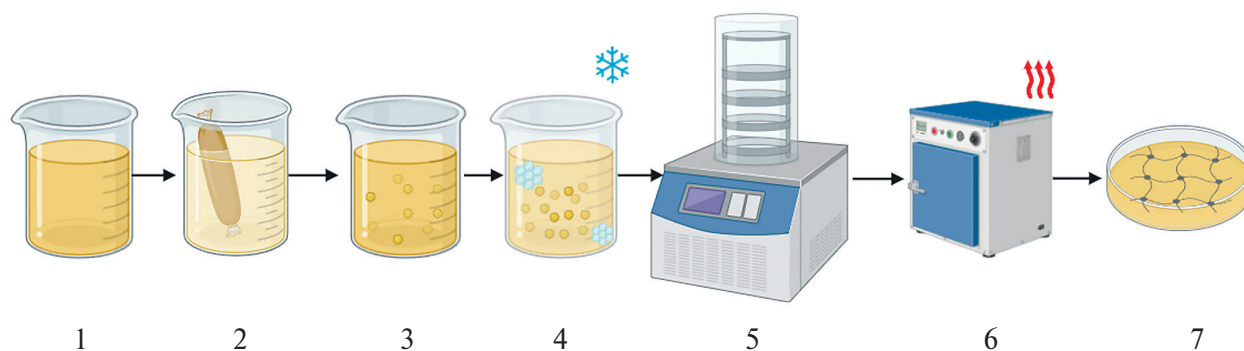


Рис. 2. Схема (этапы) получения материала: 1 — раствор хитозана (pH 2,9); 2 — диализ (pH 5,4); 3 — смешивание с ванилином; 4 — замораживание (при минус 18 °С); 5 — лиофильная сушка в течение 4 сут; 6 — нагрев при 90°С в течение 3 ч; 7 — готовый продукт (материал)

Fig. 2. Scheme (stages) for obtaining the material: 1 — chitosan solution (pH 2.9); 2 — dialysis (pH 5.4); 3 — mixing with vanillin; 4 — freezing (at minus 18°C); 5 — lyophilization for 4 days; 6 — heating at 90°C for 3 hours; 7 — finished product (material)

Для изучения морфологии поверхности полученных гидрогелей в данной работе использовалась оптическая микроскопия. Количественная обработка микрофотографий образцов синтезированных полимерных гидрогелей проводилась путем выбора эквивалентного радиуса поры с площадью, равной площади обрабатываемой поры. Поиск этого оптимума происходил визуально с использованием средств, предоставляемых программным обеспечением для обработки электронных фотографий TopView.

Пример типичных микрофотографий полученных полимерных гидрогелей хитозана представлен на рис. 3. Как можно видеть, образцы материала содержали систему крупных пор размером в десятки микрометров. Для типичного образца, представ-

ленного на фото, средний размер эквивалентного диаметра пор составлял порядка 56,7 мкм, размер 75 % пор находился в интервале значений от 30 до 70 мкм. Большая часть пор в изученных образцах гидрогелей представляла собой умеренно вытянутые поры с формой, близкой к эллиптической, со средним соотношением между наибольшим и наименьшим диаметром 3 к 2 (средний эксцентриситет порядка 0,73). Поскольку в данной работе не ставилась задача получения материалов с различной пористостью и характером распределения пор по размерам, то замораживание реакционной системы проводилось при одинаковых для всех образцов условиях, а наблюдаемая картина была характерна для всех изученных образцов материала.

(a)

(б)

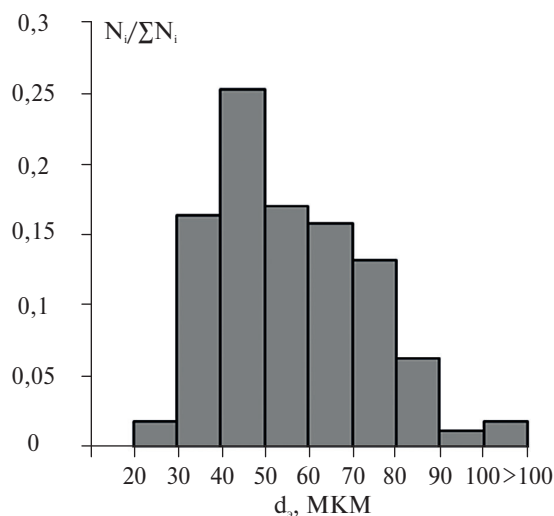
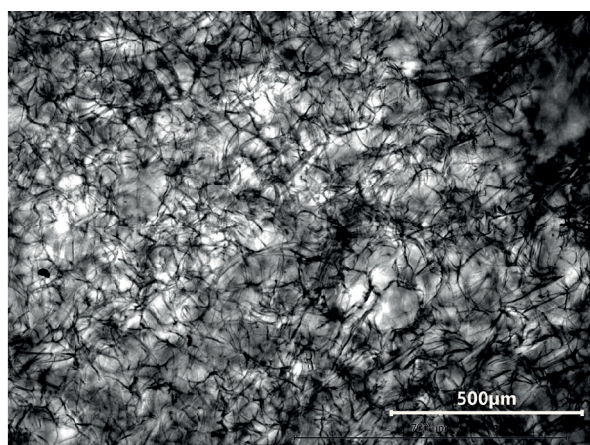


Рис. 3. Микрофотография образца материала в набухшем состоянии (a) и диаграмма распределение его пор по размерам (б)
Fig. 3. Micrograph of a sample of the material in a swollen state (a) and a diagram of its pore size distribution (b)

Поскольку одной из наиболее очевидных областей практического применения полученного макропористого материала в областях, связанных с медициной, являлось его использование в качестве основы для раневых покрытий, представляла интерес оценка его влагопоглощающей способности. Полученные результаты такого эксперимента приведены на рис. 4.

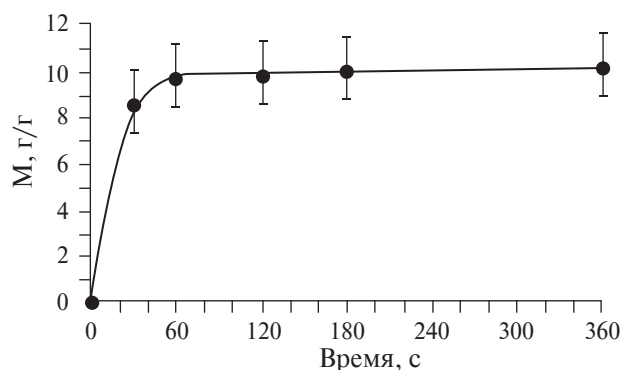


Рис. 4. Динамика влагопоглощения макропористого материала на основе хитозана при концентрации хитозана в реакционной смеси 2 % и массового соотношения хитозан/ванилин — 1/2

Fig. 4. Dynamics of water absorption of a macroporous chitosan-based material at a chitosan concentration in the reaction mixture of 2% and a chitosan/vanillin mass ratio of 1/2

Как можно видеть, полученный материал характеризовался высокой скоростью набухания, которое, в основном, завершалось всего за несколько минут. Этот факт обусловлен наличием продемонстрированной выше системы связанных между собой пор, занимающих основной объем образца.

Наличие пористой структуры обуславливало и характерный вид зависимостей «напряжение-деформация», полученных при одноосном сжатии набухших и находящихся в водной среде образцов материалов. Как можно видеть из приведенной типичной зависимости (рис. 5), на кривой имеется два явно выраженных участка. На первом участке происходит вытеснение свободной воды из макропор материала, а на втором при высоких степенях деформации начинает в заметной степени проявляться упругая деформация материала, образующего стенки пор. Модули Юнга, определенные на этих участках, составляли порядка 3,8 и 192 кПа, соответственно.

Стоит отметить, что полученные значения модулей упругости образцов пористых гидрогелей не позволили оценить упругость непосредственно их полимерной матрицы и являлись «кажущимися», поскольку, даже при их значительной одноосной деформации (из-за наличия развитой пористой структуры образца), упругая деформация их полимерной части оставалась весьма незначительной. Таким образом, реальные эластические свойства

полимерного материала, непосредственно контактирующего при его практическом использовании с клетками и иными биологическими объектами, могут быть на несколько порядков выше «кажущихся» модулей, определенных для пористых гелей. Подобная картина характерна для всех макропористых полимерных гидрогелей, имеющих открытую пористость. В то же время, несмотря на то, что определенные модули являлись «кажущимися», их численные значения давали общее представление о механических свойствах полученных материалов и поэтому могли быть полезны для оценки перспектив разработанного материала с позиций их возможного практического применения в составе изделий медицинского назначения.

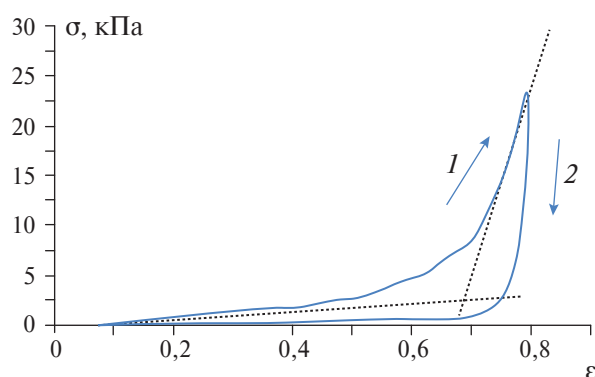


Рис. 5. Диаграмма напряжения при одноосном сжатии образца макропористого материала на основе хитозана при концентрации хитозана в реакционной смеси 2 % и массового соотношения хитозан/ванилин — 1/2: 1 — нагружение; 2 — снятие нагрузки

Fig. 5. Stress diagram for uniaxial compression of a sample of a macroporous material based on chitosan with a chitosan concentration in the reaction mixture of 2% and a chitosan/vanillin mass ratio of 1/2: 1 — loading; 2 — unloading

Полученные значения «кажущихся» модулей упругости находились в диапазоне, характерном для других гидрогелей на основе хитозана, описанных в литературе. Например, в работе [3] сообщалось о модуле сжатия порядка 150-250 кПа для хитозановых криогелей, что хорошо согласовывалось с полученным в работе результатом для области высоких деформаций (192 кПа). Известно, что механические свойства подобных материалов сильно зависят от концентрации полимера, типа шшивателя и параметров синтеза [33], что объясняет широкий разброс литературных данных. Важно отметить, что полученные в работе значения модулей упругости примерно соответствовало значениям модулей упругости соответствующих биологических тканей организма [34], что указывало на хороший потенциал материала для применения в контакте с подобными средами без риска вызвать механическое повреждение.

Как было отмечено выше, наличие у материала медико-биологического назначения собственной антимикробной активности является значительным преимуществом, поскольку не только способствует его микробиологической безопасности, но и может существенно повысить эффективность медицинских изделий на его основе.

Известно, что хитозан проявляет антимикробную активность в отношении широкого спектра микроорганизмов [35, 36]. Известно также, что антимикробная активность хитозана зависит как от его физико-химических свойств (молекулярной массы и степени деацетилирования), так и от источника его получения, концентрации в препарате и кислотности окружающей материал среды [37–40]. Поэтому представляло интерес исследовать антимикробную активность криоструктурированного пористого материала из хитозана, сшитого ванилином.

Для оценки антимикробной активности полученного материала тест-штаммы микроорганизмов *Staphylococcus aureus* FDA-209P и *Staphylococcus epidermidis* ВКПМ-В-12635 предварительно выращивали в пробирках на скошенной агаризованной

среде № 8 ГРМ в течение 24 ч при температуре 32 ± 2 °С. Из выросших 24-часовых культур были приготовлены бактериальные суспензии в физиологическом растворе (инокулят). Концентрация клеток составляла 0,5 по шкале МакФарланда, которую определяли визуальным методом, сравнивая со стандартом мутности, приготовленным на основе хлорида бария и серной кислоты (ОФС.1.7.2.0008.15 ГФ РФ XIV).

Затем в колбы с 50 мл жидкой питательной среды № 8 ГРМ вносили 0,5 мл приготовленной бактериальной суспензии (инокулят) тест-культур *Staphylococcus aureus* FDA-209P и *Staphylococcus epidermidis* ВКПМ-В-12635. В опытные колбы дополнительно вносили образцы материала в количестве 0,1 г. В контрольные колбы материал не вносили. Засеянные колбы инкубировали в термостате при 32 ± 2 °С в течение 24 ч. Рост тест-штаммов оценивали по величине оптической плотности бактериальной суспензии, измеренной на спектрофотометре UNICO 1200 при $\lambda=600$ нм в кюветах с длиной светового пути 10 мм. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1. Антибактериальная активность материала на основе хитозана в отношении тест-штаммов *Staphylococcus aureus* FDA-209P и *Staphylococcus epidermidis* ВКПМ-В-12635

Table 1. Antibacterial activity of chitosan-based material against test strains of *Staphylococcus aureus* FDA-209P and *Staphylococcus epidermidis* VKPM-B-12635

Образец	Рост тест-штаммов, ед. ОП		Ингибирование роста тест-штамма, %	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Контроль	1,15±0,13	2,57±0,12	–	–
Образец материала	0,87±0,10	2,65±0,11	24,3%	–

В условиях эксперимента была обнаружена антибактериальная активность пористого материала, полученного на основе криоструктурированного хитозана, сшитого ванилином, в отношении тест-штамма *Staphylococcus aureus*. Степень ингибирования роста штамма в жидкой питательной среде № 8 ГРМ в присутствии образцов материала составила 24 %. При этом активность роста тест-штамма *Staphylococcus epidermidis* в аналогичных условиях не изменялась.

Обнаруженная избирательная антибактериальная активность материала в отношении *S. aureus* при отсутствии влияния на рост *S. epidermidis* может быть объяснена особенностями строения клеточных стенок этих микроорганизмов [41]. Ключевым фактором являлось разное электростатическое

взаимодействие катионного полимера хитозана с отрицательно заряженными компонентами поверхности бактериальных клеток, в первую очередь — тейхоевыми кислотами. У *S. aureus* высокий отрицательный заряд тейхоевых кислот, связанный с их модификацией D-аланином, обеспечивал более эффективное взаимодействие с катионными группами хитозана, приводя к большей дестабилизации клеток [42]. В то же время *S. epidermidis*, являясь коагулаза-негативным стафилококком, имела иное строение клеточной поверхности, делающее поверхностный заряд слабее, а наличие выраженного гликокаликса создавало дополнительный физико-химический барьер для взаимодействия с хитозаном, что снижало его бактерицидную активность и делало *S. epidermidis* менее восприимчивым к действию полученного материала [43]. Степень

ингибирования роста *S. aureus* (~24 %) была умеренной и сопоставимой с данными для других сшитых форм хитозана [44, 45], что указывало на сохранение антимикробного потенциала полимера после его модификации ванилином. Известно, что химическое сшивание может несколько снижать плотность положительных зарядов на поверхности материала по сравнению с нативным хитозаном, что также может влиять на конечную антибактериальную эффективность [46].

Уровень антибактериальной активности пористого сшитого ванилином криоструктурированного хитозана позволяет предположить возможность его применения в некоторых областях. Избирательная антибактериальная активность материала в отношении отдельных видов бактерий р. *Staphylococcus* дает основание рассматривать полученный материал в качестве дополнительного средства для нормализации состава микробиоты кожи в терапии кожных заболеваний, при которых отмечается резкое увеличение количества бактерий вида *Staphylococcus aureus* [47, 48].

Обнаруженная антимикробная активность материала в отношении *Staphylococcus aureus* может также представлять интерес для хирургических отделений в качестве перевязывающего материала для сдерживания развития послеоперационных инфекций, когда преобладающим видом в микробном пейзаже являются бактерии рода *Staphylococcus* [49].

Ключевым аспектом, определяющим возможность практического применения того или иного материала медико-биологического назначения, является его стабильность к воздействию основных стерилизующих факторов, используемых в промышленности, в первую очередь ионизирующего излучения. В связи с этим изучалась возможность радиационной стерилизации полученных образцов материала. Стерилизацию проводили посредством воздействия рентгеновского излучения [29]. Доза облучения составляла 12 кГр и 25 кГр.

При выборе режима стерилизации были проведены предварительные исследования по определению бионагрузки материала перед облучением, в результате которых было установлено, что бионагрузка образца материала составила 900 КОЕ/г. В соответствии с ГОСТ ISO 11137-2-2011, для обеспечения стерильности продукта требуемое значение дозы облучения находилось в диапазоне 10,8 до 24,7 кГр.

Стерильность образцов после облучения проверяли в соответствии с ОФС 1.2.4.003.15 «Стерильность» ГФ РФ XIV методом прямого посева в жидкую питательную среду следующего состава (г/л): пептон — 10,0; дрожжевой экстракт — 5,0; NaCl — 5,0; pH среды — 6,8–7,0.

Отсутствие помутнения среды через 14 сут инкубирования подтвердило стерильность исследуемых образцов (рис. 6).

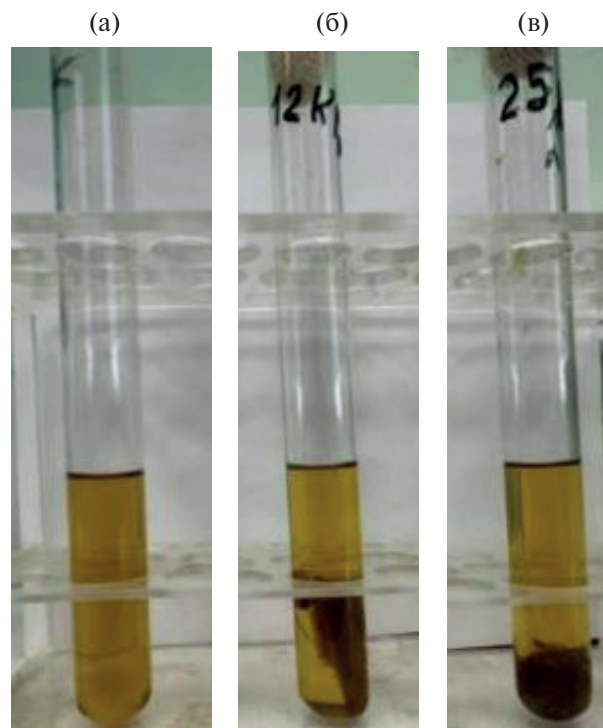


Рис. 6. Внешний вид исследуемых образцов материала основе хитозана, сшитого ванилином, через 14 сут инкубирования: а — контроль (питательная среда), б — доза облучения, 12 кГр, в — доза облучения 25 кГр

Fig. 6. Appearance of the studied samples of chitosan-based material cross-linked with vanillin after 14 days of incubation: a — control (nutrient medium), b — radiation dose, 12 kGy, c — radiation dose, 25 kGy

Также была проведена санитарно-химическая оценка образцов макропористого материала до и после воздействия ионизирующего облучения. Для этого были проведены исследования, направленные на определение параметров, регламентирующих химическую безопасность медицинских изделий при контакте с организмом человека. Все испытания выполнены в соответствии с установленными нормативами, включая ГОСТ 31209-2003, ГОСТ Р 55227-2012, РД 52.24.389-2011, ГОСТ Р 52770-2023, МУК 4.1.3166-14 и другими отраслевыми методиками.

Измерение pH водных вытяжек, показателей ультрафиолетового поглощения водных вытяжек и обнаружение наличия в них восстановительных примесей не выявило статистически значимых различий этих характеристик у «исходных» образцов и образцов после облучения. Также практически неизменными оставались и модули упругости набухших образцов, определяемые при одноосном сжатии, а также значения равновесной набухшимости. Как показали проведенные измерения, значения модулей упругости для облученных образцов при дозе 12 кГр составили $3,6 \pm 0,3$ и 185 ± 21 кПа, а при дозе 25 кГр — $3,7 \pm 0,4$ и 198 ± 24 кПа,

равновесной степени набухания же — $10,5 \pm 1,4$ и $10,2 \pm 1,7$ г/г соответственно, что статистически не отличалось ($p > 0,05$) от показателей необлученных образцов ($3,8 \pm 0,3$ и 192 ± 27 кПа и $10,1 \pm 1,4$ г/г соответственно), что свидетельствовало о стабильности материала при воздействии стерилизующего облучения при дозах до 25 кГр.

Таким образом, в результате был разработан и охарактеризован макропористый материал на основе хитозана, сшитого ванилином. Продемонстрировано, что метод криоструктурирования позволяет получать материал с развитой системой

пор, высокой скоростью набухания и приемлемыми механическими свойствами. Установлена избирательная антибактериальная активность материала в отношении *Staphylococcus aureus*. Показана стабильность ключевых характеристик материала после стерилизации ионизирующим излучением в дозах до 25 кГр. Полученные результаты подтверждают перспективность разработанного материала для использования в качестве основы для раневых покрытий и изготовления других медицинских изделий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thomas S., Pius A., Gopi S. (Eds.)*. Handbook of Chitin and Chitosan: Chitin- and Chitosan-based Polymer Materials for Various Applications. 1st ed. Elsevier, 2020. Vol. 3.
2. *Sedyakina N., Kuskov A., Velonia K. et al.* Novel Formulation of Methylprednisolone Acetate in Polymeric Microspheres Based on Chitosan and Its Derivatives // *Materials*. 2020. V. 13. № 8. P. 1989. <https://doi.org/10.3390/ma13081989>
3. *Cao S., Bi Z., Li Q. et al.* A self-healing, magnetic and injectable biopolymer hydrogel generated by dual cross-linking for drug delivery // *Carbohydr. Polym.* 2023. V. 305. P. 120545. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120545>
4. *Do N.H.N., Truong Q.T., Le P.K., Ha A. C.* Recent developments in chitosan hydrogels carrying natural bioactive compounds // *Carbohydr. Polym.* 2022. V. 294. P. 119726. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119726>
5. *Rinaudo M.* Chitin and chitosan: Properties and applications // *Prog. Polym. Sci.* 2006. V. 31. № 7. P. 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
6. *Cheung R.C.F., Ng T.B., Wong J.H. et al.* Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications // *Mar. Drugs*. 2015. V. 13. № 8. P. 5156–5186. <https://doi.org/10.3390/md13085156>
7. *Ishihara M., Kishimoto S., Nakamura S. et al.* Chitosan hydrogel as a drug delivery carrier to control angiogenesis // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2020. V. 31. № 3. P. 350–365. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1692642>
8. *Eigel D., Werner C.* Hydrogels for central nervous system therapeutic applications // *Neurochem. Int.* 2021. V. 147. P. 105012. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105012>
9. *Zhu T., Mao J., Cheng Y. et al.* Recent Progress of Polysaccharide-Based Hydrogels for Wound Healing Applications // *Adv. Healthc. Mater.* 2023. V. 12. № 16. P. 2201974. <https://doi.org/10.1002/adhm.202201974>
10. *Tong Z., Meng J., Liu S. et al.* Microfluidic-assisted fabrication of dual-crosslinked chitosan microgels for drug delivery // *Carbohydr. Polym.* 2021. V. 272. P. 118509. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118509>
11. *Lee S.S., Kim B., Kim S.K. et al.* Hydrogels for delivery of bioactive agents: A historical perspective // *Nat. Rev. Mater.* 2018. V. 3. P. 1–15. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.75>
12. *Shapiro L., Cohen S.* Novel alginate sponges for cell culture and transplantation // *Biomaterials*. 1997. V. 18. P. 583–593. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00181-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00181-0)
13. *Chen J., Park P., Park K.* Synthesis and characterization of superporous hydrogel composites // *J. Biomed. Mater. Res.* 1999. V. 44. P. 53–62. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199901\)44:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199901)44:1)
14. *Chen J., Blevins W.E., Park H., Park K.* Gastric retention properties of superporous hydrogel composites // *J. Control. Release*. 2000. V. 64. P. 39–51. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00139-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00139-X)
15. *Horak D., Lednický F., Bleha M.* Effect of inert components on the porous structure of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels // *Polymer*. 1996. V. 37. P. 4243–4249. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(96\)00256-5](https://doi.org/10.1016/0032-3861(96)00256-5)
16. *Liu Q., Hedberg E.L., Liu Z. et al.* Preparation of macroporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels by enhanced phase separation // *Biomaterials*. 2000. V. 21. P. 2163–2169. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00099-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00099-4)
17. *Lozinsky V.I., Plieva F.M., Galaev I.Yu.* The potential of polymeric cryogels in bioseparation // *Bioseparation*. 2001. V. 10. P. 163–188. <https://doi.org/10.1023/A:1016386902611>
18. *Oxley H.R., Corkhill P.H., Fitton J.H., Tighe B.J.* Macroporous hydrogels for biomedical applications: methodology and morphology // *Biomaterials*. 1996. V. 14. P. 1064–1072. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)89407-8](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)89407-8)
19. *Přádný M., Lesný P., Fiala J. et al.* Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2003. V. 68. P. 812–822. <https://doi.org/10.1135/cccc20030812>

20. Çimen D., Özbek M.A., Bereli N. et al. Chitosan Cryogels for Biomedical Applications // *Gels*. 2021. V. 7. P. 38. <https://doi.org/10.3390/gels7020038>
21. Kean T., Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010. V. 62. № 1. P. 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>
22. Ali A., Ahmed S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 109. P. 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>
23. Byun S.M., No H.K., Hong J.H. et al. Comparison of physicochemical, antioxidant, and antibacterial properties of chitosans prepared from crab and shrimp shells // *Int. J. Food Sci. Technol.* 2013. V. 48. P. 136–142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03169.x>
24. Kulikov S., Chirkov S., I'ina A. et al. Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. V. 42. P. 200–203. <https://doi.org/10.1134/S0003683806020165>
25. Meng X., Xing R., Liu S. et al. Molecular weight and pH effects of aminoethyl modified chitosan on antibacterial activity in vitro // *Int. J. Biol. Macromol.* 2012. V. 50. P. 918–924. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.01.018>
26. Ravi Kumar M.N.V., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C. et al. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives // *Chem. Rev.* 2004. V. 104. P. 6017–6084. <https://doi.org/10.1021/cr030441b>
27. Matica M.A., Aachmann F.L., Tøndervik A. et al. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 5889. <https://doi.org/10.3390/ijms20235889>
28. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
29. Фенин А.А., Антропова И.Г., Горностаева С.В. Практикум по радиационной химии: учеб. пособие. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2016. 64 с.
30. Мельников М.Я., Багрянская Е.Г., Вайнштейн Ю.А. и др. Экспериментальные методы химии высоких энергий / Под общ. ред. М.Я. Мельникова. М.: Изд-во Московского университета, 2009. 824 с.
31. Nikonorov V., Ivanov R., Kil'deeva N. et al. Effect of polymer precursor molecular weight on the porous structure of chitosan sponges // *Polym. Sci. Ser. A*. 2010. V. 52. № 8. P. 828–834. <https://doi.org/10.1134/S0965545X10080092>
32. Murphy C., Haugh M., O'Brien F. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering // *Biomaterials*. 2010. V. 31. P. 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.063>
33. Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications // *Prog. Polym. Sci.* 2011. V. 36. № 8. P. 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
34. Zadpoor A.A. Mechanical performance of additively manufactured meta-biomaterials // *Materials*. 2015. V. 8. № 7. P. 4505–4511. <https://doi.org/10.3390/ma8074505>
35. Roller S., Covill N. The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads // *Int. J. Food Microbiol.* 1999. V. 47. P. 67–77. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00008-9)
36. Vadivel T., Dhamodaran M. Synthesis, characterization and antibacterial studies of ruthenium(III) complexes derived from chitosan Schiff base // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. V. 90. P. 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.079>
37. Mohamed N.A., El-Ghany N.A.A. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of carboxymethyl chitosan Schiff bases with different benzaldehyde derivatives // *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 2022. V. 3. P. 100202. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100202>
38. Hosseinnejad M., Jafari S.M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. V. 85. P. 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.017>
39. Choi B.K., Kim K.Y., Yoo Y.J. et al. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans* // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2001. V. 18. P. 553–557. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00434-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00434-4)
40. Lim S.H., Hudson S.M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group // *Carbohydr. Res.* 2004. V. 339. P. 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.02.001>
41. Kong M., Chen X.G., Liu C.S. et al. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli* // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2008. V. 65. № 2. P. 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.04.003>
42. Liu H., Du Y., Wang X., Sun L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage // *Int. J. Food Microbiol.* 2004. V. 95. № 2. P. 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022>
43. Carlson R.P., Taffs R., Davison W.M., Stewart P.S. Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2008. V. 19. № 8. P. 1035–1046. <https://doi.org/10.1163/156856208784909372>

44. Li J., Wu Y., Zhao L. Antibacterial activity and mechanism of chitosan with ultra high molecular weight // *Carbohydr. Polym.* 2016. V. 148. P. 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.025>
45. Verlee A., Mincke S., Stevens C.V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives // *Carbohydr. Polym.* 2017. V. 164. P. 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>
46. Islam M.M., Shahruzzaman M., Biswas S. et al. Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications—A review // *Bioact. Mater.* 2020. V. 5. № 1. P. 164–183. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>
47. Fölster-Holst R. Atopic dermatitis: pathogenesis and clinical findings // *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 2022. V. 20. № 5. P. 571–577. <https://doi.org/10.1111/ddg.14759>
48. Geoghegan J.A., Irvine A.D., Foster T.J. Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship // *Trends Microbiol.* 2018. V. 26. № 6. P. 484–497. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.008>
49. Шаркова В.А., Лайман Е.Ф., Баранова Н.А. Изучение антибактериальной активности хитозана и его производных в отношении возбудителей внутрибольничных инфекций // *Фундаментальные исследования.* 2012. № 5(2). С. 379–383. <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=29940>

REFERENCES

1. Thomas S., Pius A., Gopi S. (Eds.). *Handbook of Chitin and Chitosan: Chitin- and Chitosan-based Polymer Materials for Various Applications*. 1st ed. Elsevier, 2020, Vol. 3.
2. Sedyakina N., Kuskov A., Velonia K. et al. Novel Formulation of Methylprednisolone Acetate in Polymeric Microspheres Based on Chitosan and Its Derivatives // *Materials*, 2020, vol. 13, no. 8, pp. 1989. <https://doi.org/10.3390/ma13081989>
3. Cao S., Bi Z., Li Q. et al. A self-healing, magnetic and injectable biopolymer hydrogel generated by dual cross-linking for drug delivery // *Carbohydr. Polym.* 2023, vol. 305, pp. 120545. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120545>
4. Do N.H.N., Truong Q.T., Le P.K., Ha A. C. Recent developments in chitosan hydrogels carrying natural bioactive compounds // *Carbohydr. Polym.* 2022, vol. 294, pp. 119726. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119726>
5. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications // *Prog. Polym. Sci.*, 2006, vol. 31, no. 7, pp. 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
6. Cheung R.C.F., Ng T.B., Wong J.H. et al. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications // *Mar. Drugs.*, 2015, vol. 13, no. 8, pp. 5156–5186. <https://doi.org/10.3390/md13085156>
7. Ishihara M., Kishimoto S., Nakamura S. et al. Chitosan hydrogel as a drug delivery carrier to control angiogenesis // *J. Biomater. Sci. Polym.* Ed. 2020, vol. 31, no. 3, pp. 350–365. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1692642>
8. Eigel D., Werner C. Hydrogels for central nervous system therapeutic applications // *Neurochem. Int.*, 2021, vol. 147, pp. 105012. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105012>
9. Zhu T., Mao J., Cheng Y. et al. Recent Progress of Polysaccharide-Based Hydrogels for Wound Healing Applications // *Adv. Healthc. Mater.*, 2023, vol. 12, no. 16, pp. 2201974. <https://doi.org/10.1002/adhm.202201974>
10. Tong Z., Meng J., Liu S. et al. Microfluidic-assisted fabrication of dual-crosslinked chitosan microgels for drug delivery // *Carbohydr. Polym.*, 2021, vol. 272, pp. 118509. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118509>
11. Lee S.S., Kim B., Kim S.K. et al. Hydrogels for delivery of bioactive agents: A historical perspective // *Nat. Rev. Mater.*, 2018, vol. 3, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.75>
12. Shapiro L., Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation // *Biomaterials.*, 1997, vol. 18, pp. 583–593. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00181-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00181-0)
13. Chen J., Park P., Park K. Synthesis and characterization of superporous hydrogel composites // *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, vol. 44, pp. 53–62. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199901\)44:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199901)44:1)
14. Chen J., Blevins W.E., Park H., Park K. Gastric retention properties of superporous hydrogel composites // *J. Control. Release.*, 2000, vol. 64, pp. 39–51. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00139-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00139-X)
15. Horak D., Lednicky F., Bleha M. Effect of inert components on the porous structure of poly(2-hydroxyethylmethacrylate) hydrogels // *Polymer.*, 1996, vol. 37, pp. 4243–4249. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(96\)00256-5](https://doi.org/10.1016/0032-3861(96)00256-5)
16. Liu Q., Hedberg E.L., Liu Z. et al. Preparation of macroporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels by enhanced phase separation // *Biomaterials.*, 2000, vol. 21, pp. 2163–2169. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00099-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00099-4)

17. Lozinsky V.I., Plieva F.M., Galaev I.Yu. The potential of polymeric cryogels in bioseparation // *Bioseparation.*, 2001, vol. 10, pp. 163–188. <https://doi.org/10.1023/A:1016386902611>
18. Oxley H.R., Corkhill P.H., Fitton J.H., Tighe B.J. Macroporous hydrogels for biomedical applications: methodology and morphology // *Biomaterials.*, 1996, vol. 14, pp. 1064–1072. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)89407-8](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)89407-8)
19. Přadny M., Lesný P., Fiala J. et al. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate // *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 2003, vol. 68, pp. 812–822. <https://doi.org/10.1135/cccc20030812>
20. Çimen D., Özbek M.A., Bereli N. et al. Chitosan Cryogels for Biomedical Applications // *Gels.*, 2021, vol. 7, pp. 38. <https://doi.org/10.3390/gels7020038>
21. Kean T., Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan // *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, vol. 62, no. 1, pp. 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>
22. Ali A., Ahmed S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery // *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, vol. 109, pp. 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>
23. Byun S.M., No H.K., Hong J.H. et al. Comparison of physicochemical, antioxidant, and antibacterial properties of chitosans prepared from crab and shrimp shells // *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2013, vol. 48, pp. 136–142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03169.x>
24. Kulikov S., Chirkov S., Il'ina A. et al. Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants // *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2006, vol. 42, pp. 200–203. <https://doi.org/10.1134/S0003683806020165>
25. Meng X., Xing R., Liu S. et al. Molecular weight and pH effects of aminoethyl modified chitosan on antibacterial activity in vitro // *Int. J. Biol. Macromol.*, 2012, vol. 50, pp. 918–924. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.01.018>
26. Ravi Kumar M.N.V., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C. et al. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives // *Chem. Rev.*, 2004, vol. 104, pp. 6017–6084. <https://doi.org/10.1021/cr030441b>
27. Matica M.A., Aachmann F.L., Tøndervik A. et al. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action // *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, pp. 5889. <https://doi.org/10.3390/ijms20235889>
28. Netrusov A.I. Praktikum po mikrobiologii (Microbiology Practicum). *Moscow: Akademiya*, 2005, 608 p. (In Russ.)
29. Fenin A.A., Antropova I.G., Gornostaeva S.V. Praktikum po radiatsionnoi khimii (Radiation Chemistry Practicum). *Moscow: Mendeleev University of Chemical Technology*, 2016, 64 p. (In Russ.)
30. Melnikov M.Ya., Bagryanskaya E.G., Vainshtein Yu.A. et al. Eksperimental'nye metody khimii vysokikh energii (Experimental Methods of High Energy Chemistry). *Moscow: Moscow University Press*, 2009, 824 p. (In Russ.)
31. Nikonorov V., Ivanov R., Kil'deeva N. et al. Effect of polymer precursor molecular weight on the porous structure of chitosan sponges // *Polym. Sci. Ser. A.*, 2010, vol. 52, no. 8, pp. 828–834. <https://doi.org/10.1134/S0965545X10080092>
32. Murphy C., Haugh M., O'Brien F. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering // *Biomaterials.*, 2010, vol. 31, pp. 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.063>
33. Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications // *Prog. Polym. Sci.*, 2011, vol. 36, no. 8, pp. 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
34. Zadpoor A.A. Mechanical performance of additively manufactured meta-biomaterials // *Materials*, 2015, vol. 8, no. 7, pp. 4505–4511. <https://doi.org/10.3390/ma8074505>
35. Roller S., Covill N. The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads // *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, vol. 47, pp. 67–77. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00008-9)
36. Vadivel T., Dhamodaran M. Synthesis, characterization and antibacterial studies of ruthenium(III) complexes derived from chitosan Schiff base // *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, vol. 90, pp. 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.079>
37. Mohamed N.A., El-Ghany N.A.A. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of carboxymethyl chitosan Schiff bases with different benzaldehyde derivatives // *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.*, 2022, vol. 3, pp. 100202. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100202>
38. Hosseinnejad M., Jafari S.M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan // *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, vol. 85, pp. 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.017>
39. Choi B.K., Kim K.Y., Yoo Y.J. et al. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans* // *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2001, vol. 18, pp. 553–557. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00434-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00434-4)
40. Lim S.H., Hudson S.M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group // *Carbohydr. Res.*, 2004, vol. 339, pp. 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.02.001>

41. Kong M., Chen X.G., Liu C.S. et al. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli* // *Colloids Surf. B Biointerfaces.*, 2008, vol. 65, no. 2, pp. 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.04.003>
42. Liu H., Du Y., Wang X., Sun L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage // *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, vol. 95, no. 2, pp. 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022>
43. Carlson R.P., Taffs R., Davison W.M., Stewart P.S. Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2008, vol. 19, no. 8, pp. 1035–1046. <https://doi.org/10.1163/156856208784909372>
44. Li J., Wu Y., Zhao L. Antibacterial activity and mechanism of chitosan with ultra high molecular weight // *Carbohydr. Polym.*, 2016, vol. 148, pp. 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.025>
45. Verlee A., Mincke S., Stevens C.V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives // *Carbohydr. Polym.*, 2017, vol. 164, pp. 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>
46. Islam M.M., Shahrizzaman M., Biswas S. et al. Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications—A review // *Bioact. Mater.*, 2020, vol. 5, no. 1, pp. 164–183. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>
47. Fölster-Holst R. Atopic dermatitis: pathogenesis and clinical findings // *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 2022, vol. 20, no. 5, pp. 571–577. <https://doi.org/10.1111/ddg.14759>
48. Geoghegan J.A., Irvine A.D., Foster T.J. Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship // *Trends Microbiol.*, 2018, vol. 26, no. 6, pp. 484–497. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.008>
49. Sharkova V.A., Laiman E.F., Baranova N.A. *Fundamental'nye issledovaniya*, 2012, no. 5(2), pp. 379–383. (In Russ.) <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=29940>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Делич Маша — студент, Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Российская Федерация
E-mail: delicmasa2001@gmail.com

Колосов Кирилл Леонидович — руководитель группы санитарно-химических испытаний испытательной лаборатории «Токсиколог» ООО "Национальный научный центр токсикологической и биологической безопасности медицинских изделий", Москва, Российская Федерация
E-mail: k.kolosov@toxicolog.ru

Буторова Ирина Анатольевна — доцент Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Российская Федерация
E-mail: butorova.i.a@muctr.ru

Антропова Ирина Геннадьевна — доцент Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Российская Федерация
E-mail: antropova.i.g@muctr.ru

Подорожко Елена Анатольевна — ведущий научный сотрудник Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Российская Федерация

Беняев Негмат Ефремович — д.т.н., профессор, руководитель испытательной лаборатории «Токсиколог» ООО «Национальный научный центр токсикологической и биологической безопасности медицинских изделий», Москва, Российская Федерация
E-mail: negmat@inbox.ru

ABOUT THE AUTHORS

Delic Masha — student, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: delicmasa2001@gmail.com

Kolosov, Kirill L. — Head of medical devices testing, testing laboratory «Toxicolog», «National Scientific Center for Toxicological and Biological Safety of Medical Devices» LLC, Moscow, Russian Federation
E-mail: k.kolosov@toxicolog.ru

Butorova, Irina A. — Associate professor Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: butorova.i.a@muctr.ru

Antropova, Irina G. — Associate Professor Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: antropova.i.g@muctr.ru

Podorozhko, Elena A. — Leading Researcher Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences Moscow, Russian Federation

Benyaev, Negmat E. — Ph.D. (Engineering), professor, Head of testing laboratory «Toxicolog», «National Scientific Center for Toxicological and Biological Safety of Medical Devices» LLC, Moscow, Russian Federation
E-mail: negmat@inbox.ru

Артюхов Александр Анатольевич — профессор
Российский химико-технологический университет
им. Д.И. Менделеева, Москва, Российская Феде-
рация

E-mail: artyukhow@yandex.ru

Кусков Андрей Николаевич — профессор, Россий-
ский химико-технологический университет им.
Д.И. Менделеева, Москва, Российская Федерация

E-mail: kuskov.a.n@muctr.ru

Artyukhov, Alexander A. — professor Mendeleev
University of Chemical Technology of Russia, Moscow,
Russian Federation

E-mail: artyukhow@yandex.ru

Kuskov, Andrey N. — professor, Mendeleev University
of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian
Federation

E-mail: kuskov.a.n@muctr.ru

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 19.10.2025

Принята к публикации 07.12.2025

Received June 30, 2025

Revised October 19, 2025

Accepted December 07, 2025