

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 57.08:615.461

**ОБ ОТДЕЛЬНЫХ АСПЕКТАХ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ
ОБРАЗЦОВ ХИТОЗАНА В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ****Халимов Р.И., Омелько Н.А., Русин Е.Е.***Алтайский государственный университет, Барнаул, e-mail: beholder1730@mail.ru*

Настоящий обзор рассматривает влияние, которое технологии получения хитозана и его подготовки к применению в биомедицинских исследованиях оказывают на его физико-химические и биологические свойства. Описаны основные подходы к получению хитозана из природного сырья, а также основные и эмергентные источники хитина. Подчёркнуты неодинаковые свойства хитина, содержащегося в различных источниках, и описаны теоретические основы, связывающие данные свойства со свойствами получаемого хитозана. Также в данной работе рассмотрены экспериментально подтверждённые различия в физико-химических свойствах хитозана, выделенного из различных источников. Помимо этого представлена совокупность имеющихся данных, характеризующих токсичность и биосовместимость хитозана в качестве материала для применения в регенеративной медицине и тканевой инженерии. Отдельно описана существенная проблема характеристики образцов хитозана с различным происхождением и различной молекулярной массой, которая может быть причиной низкой воспроизводимости результатов исследований хитозана. Невозможность точного определения молекулярной массы хитозана без экспериментального её измерения взаимно связана с зачастую недостаточной ясностью источника его происхождения. Подобная запутанность может стать непреодолимым препятствием на пути создания стандартизованных продуктов и медицинских изделий на основе хитозана.

Ключевые слова: хитозан, биополимер, скаффолд, регенеративная медицина, тканевая инженерия**ON INDIVIDUAL ASPECTS OF CHITOSAN SAMPLES
CHARACTERISATION IN BIOMEDICAL RESEARCH****Khalimov R.I., Omelko N.A., Rusin E.E.***Altai State University, Barnaul, e-mail: beholder1730@mail.ru*

Present review considers the influence that technologies of the chitosan procurement and its preparation to use in a biomedical research have over its physico-chemical and biological properties. Main approaches to chitosan preparation from the natural sources, as well as primary and emergent sources of chitin are described. Unequal properties of the chitin contained in different sources are emphasized and theoretical basis linking said properties to the properties of a prepared chitosan is described. Experimentally confirmed differences in physico-chemical properties of a chitosan prepared from the different sources are also reviewed in this work. Besides this, the sum of existing data characterizing toxicity and biocompatibility of the chitosan as material for the use in regenerative medicine and tissue engineering. Separately is described the substantial problem of the characterization of the chitosan samples of different origin and with different molecular mass. The inability to precisely determine molecular mass of chitosan without experimental measurement of it is mutually linked to the inadequate clarity of its source. Such complexity may become an insurmountable obstacle on the way to creating standardized chitosan-based products and medical devices.

Keywords: chitosan, biopolymer, scaffold, regenerative medicine, tissue engineering

Хитозан является природным биополимером, активно используемым в медицине для создания материалов с контролируемыми свойствами. Одним из направлений его использования является получение скаффолдов (от англ. «scaffold» – «каркас»), используемых для строго ориентированного в пространстве культивирования клеток *in vitro* и *in vivo*. При этом, значительный интерес исследователей к хитозану, как компоненту скаффолдов, выявил не только широкий спектр возможностей его применения, но и значительные проблемы при сопоставлении данных различных исследований.

Данная работа описывает трудности, возникающие при попытке сравнения результатов исследований различных образцов хитозана, а также их причины, выявленные в ходе работ ряда научных коллективов.

Получение хитозана

Хитозан является распространённым в природе соединением с молекулярной структурой, дающей значительные возможности химической модификации, представляющим собой случайный сополимер D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина.

Хитозан получают из хитина, который является широко распространённым биополимером. В природе хитин может встречаться в трёх основных полиморфических формах – альфа-, бета- и гамма-хитина. Эти формы отличаются взаимным расположением цепочек хитина в общей массе – у альфа-хитина они расположены антипараллельно, у бета-хитина – параллельно, а гамма-хитин сформирован смесью параллельных и антипараллельных цепей [1]. Эти три формы

хитина обладают близкими, но неодинаковыми физико-химическими свойствами [2].

Хитин, в свою очередь, может быть получен из панцирей ракообразных, промысел и аквакультура которых в настоящее время являются основным источником хитозана [3-5]. Также возможно получение хитозана из биомассы грибов [6, 7]. Обе эти группы источников хорошо освещены в научной литературе и выделение хитозана может проводиться из множества разных видов-продуцентов.

Альтернативным источником хитозана являются насекомые, при этом, как и в остальных случаях, вид-продуцент может значительно отличаться – от коконов шелкопряда до взрослых особей колорадского жука [8-10]. В литературе приводятся доводы в пользу того, что такой хитозан легкодоступен в связи с простотой выращивания насекомых и высокими темпами их воспроизводства. При этом выделение хитозана из экзоскелета насекомых требует менее жёстких условий и происходит с большим выходом, нежели его выделение из панцирей ракообразных [11].

Одним из наименее изученных источников хитозана являются отходы переработки моллюсков, включая рудиментарные раковины кальмаров и каракатиц [12, 13]. Пониженный интерес исследователей может быть вызван особенностями строения хитина моллюсков, представленного, в основном, бета-формой.

Следует отметить, что существуют различия в физико-химических и биологических свойствах хитозана, полученного из различных источников и с применением различных методов. Данные различия могут оказывать решающее действие на эффективность применения конечного продукта, и будут рассмотрены в данном обзоре.

Хитозан получают путём деацетилирования хитина. При традиционном подходе к химической экстракции, выделение хитозана из природного сырья проходит в три основных этапа. Первым этапом, особенно важным при переработке панцирей ракообразных и моллюсков, является деминерализация раствором кислоты. Вторым и третьим этапом являются депротеинизация сырья и деацетилирование хитина соответственно. Основным способом выполнения этих этапов является использование концентрированных растворов щелочей, при этом наиболее распространено применение раствора гидроксида натрия в концентрации 30-60%, которое, помимо всего прочего, позволяет провести депротеинизацию и деацетилирование одновременно

[14]. Следует также отметить, что некоторыми авторами предлагаются сходные протоколы, при которых депротеинизация слабым раствором щёлочи или протеолитическими ферментами производится перед деминерализацией [15, 16]. Степень деацетилирования, как правило, выражается в процентах, и от неё зависит растворимость хитозана в кислотах, а также его противомикробная активность и плотность образуемых им гелей [17-19].

Немаловажно подчеркнуть, что, наряду с другими нюансами происхождения хитозана, способ его экстракции может влиять на результаты последующих экспериментов. Вариативности в этом случае подвержены не только физико-химические свойства, такие как степень деацетилирования хитозана и его вязкость в растворе, но и биологическая активность. Так, Younes и соавторы, изучая различные способы ферментативной депротеинизации панцирей креветок, обнаружили статистически достоверные, разнонаправленные различия в противомикробной активности хитозана, полученного различными способами [16].

Гипотетически, существует возможность проводить энзиматическое деацетилирование хитина с использованием специфических ферментов, отщепляющих остатки уксусной кислоты. Ферменты с такой активностью известны, однако на практике не применяются из-за низкой эффективности [20].

Цитотоксичность хитозана

Значительный объём экспериментальных данных посвящён естественной токсичности хитозана в отношении бактериальных клеток, что делает его крайне привлекательным материалом в областях, где предотвращение постимплантационных инфекций является приоритетом. Хирургия в целом и, в особенности, трансплантация органов являются одной из таких областей медицины, чем обусловлен интерес к хитозану, как, например, компоненту шовных материалов [21, 22].

Противомикробные свойства хитозана и его производных рассматриваются в значительном количестве литературных источников и представляют собой хорошо изученное поле для исследований. К сожалению, подобный массив данных выходит за рамки данного обзора.

При этом хитозан также давно известен своим неблагоприятным воздействием на клетки эукариот [23, 24]. С одной стороны, эта особенность накладывает огра-

ничения на его использование в качестве материала для регенеративной медицины. С другой стороны, ограничение миграции клеток в область введения хитозановых продуктов может привести к неожиданным положительным эффектам. Так, например, Altinel и соавторы указывают, что снижение миграции фибробластов приводило к снижению рубцевания в хирургической ране, ушитой шовным материалом, обработанным хитозаном [25].

Таким образом, нельзя утверждать, что воздействие хитозана на клеточное микроокружение делает его однозначно подходящим или неподходящим для того или иного биомедицинского применения. Подобные выводы предпочтительно делать для каждого конкретного случая на основе данных, полученных в релевантной экспериментальной модели.

Биоразлагаемость и биосовместимость хитозана

Взаимосвязь между биоразлагаемостью и биосовместимостью имплантируемых каркасов является предметом дискуссии. После введения скаффолда в организм, излишне выраженная реакция на чужеродное тело может замедлить восстановление целостности тканей или даже не позволить ему завершиться полностью – например, приведя к фиброзу. Помимо этого, продукты деградации скаффолда могут вызвать изменения физико-химических характеристик микроокружения в ткани или спровоцировать иммунный ответ, что, в свою очередь, сказывается на высвобождении иммобилизованных в скаффолде биологически активных соединений, а также на миграции и пролиферации окружающих клеток [26]. Эти нюансы требуют глубокого понимания механизмов биodeградации используемых для создания биополимерных каркасов.

Поскольку иммунный ответ является первой реакцией организма на травму и чужеродный материал, привнесённый введением скаффолда, биосовместимость последнего играет ключевую роль в предотвращении отторжения импланта и последующей полноценной регенерации окружающих тканей. Воспалительная фаза иммунного ответа может замедлять заживление и приводить к нежелательным реакциям, однако иммунный ответ может также ускорить заживление тканей в месте имплантации и вызывать более полноценное заживление с функциональной точки зрения, например, стимулируя неогенез волосяных луковиц [27, 28]. Подобная дво-

якая роль иммунитета во взаимодействии имплантированного скаффолда и организма реципиента связана с цитокинами и клетками, участвующими в воспалительной реакции и при этом запускающими процесс регенерации, такими как TNF- α или нейтрофилы. Это указывает на необходимость поиска определённого баланса между биосовместимостью скаффолдов и их иммуногенностью, что достигается за счёт модификаций скаффолда с использованием различных соединений или даже путём простого изменения физической архитектуры [29]. На данный момент можно с уверенностью утверждать, что для эффективного использования иммунного ответа организма на имплантацию необходимо контролировать не только деградацию скаффолда и высвобождение веществ из него, но и собственную иммунную систему организма. Попытки предотвратить развитие воспалительного ответа приводят к повышению частоты осложнений при имплантации скаффолдов, используемых, например, в регенерации костной и хрящевой тканей. Так, снижение адгезивных свойств скаффолда одновременно мешает взаимодействию с ним как иммунных клеток, так и клеток заживляемой ткани, вследствие чего снижение нежелательного иммунного ответа сопровождается замедлением регенерации [30].

Необходимо принимать во внимание тот факт, что иммуногенность скаффолда, а также скорость и способ его биodeградации могут зависеть от его простых физико-химических и структурных характеристик. На способность хитозана взаимодействовать с клетками иммунной системы влияют его pH, а также жёсткость и размер пор. При этом данные характеристики у скаффолдов на основе хитозана могут существенно различаться [31, 19].

Рассматривая биodeградацию хитозана, следует в первую очередь ориентироваться на его полигликозидную структуру. Организм человека не содержит специфических ферментов, разрушающих хитозан, однако он может быть гидролизован рядом неспецифических ферментов, включая лизоцим. Распад хитозана приводит к образованию нетоксичных олигосахаридов с различной длиной цепи, которые могут выводиться из организма или включаться в метаболические пути в виде свободного глюкозамина.

Существуют данные, свидетельствующие о связи между скоростью биodeградации хитозана и его характеристиками, а именно молекулярной массой, степенью

деацетилирования и распределением ацетилированных глюкозаминовых остатков в молекуле. Все эти характеристики связаны со степенью кристаллизации хитозана, который в чистом виде представляет собой полукристаллический полимер. Степень кристаллизации максимальна в чистом хитине (100% остатков ацетилированы) и в полностью деацетилированном хитозане (0% остатков ацетилированы). В промежуточных формах степень кристаллизации снижается и становится минимальной при степени деацетилирования около 60% (40% остатков ацетилированы). Скорость биodeградации обратно пропорциональна степени кристаллизации и, таким образом, максимальна при степени деацетилирования около 60% [32]. Равномерность распределения ацетилированных остатков хитозана в молекуле не только влияет на равномерность кристаллизации, но и может напрямую сказываться на биологической активности [33]. Тем не менее, следует отметить, что распределение ацетилированных остатков – случайный процесс и получить неравномерно ацетилированные молекулы хитозана можно лишь путём целенаправленного синтеза [34]. Также биodeградация хитозана ускоряется с уменьшением его молекулярной массы за счёт повышения растворимости. Подробнее вопрос определения молекулярной массы хитозана будет рассмотрен в соответствующем разделе данного обзора.

При этом значительное влияние на биodeградацию хитозана оказывается непосредственное микроокружение [35]. Данные различия могут быть связаны как со степенью выраженности иммунного ответа в месте имплантации, так и с непосредственными характеристиками окружающих тканей, таких как уровень кровоснабжения и экспрессии гидролитических ферментов.

Различия по определению молекулярной массы

Многие исследования описывают антимикробное действие хитозана и/или его биологическую активность в многоклеточных организмах. Однако, несмотря на объём доступной литературы, практически невозможно сравнить между собой изложенные в ней результаты исследований, поскольку использованные авторами образцы хитозана чаще всего охарактеризованы в ненадлежащей степени. Так, уже были приведены данные, свидетельствующие о различной скорости биodeградации хитозана различной молекулярной массы. Эти данные до-

полняются также большим набором свидетельств о различном ответе живых систем на хитозан различной молекулярной массы [36]. Хитозан по длине своей молекулярной цепи может быть условно разделён на олиго-хитозан, а также хитозан малой, средней и высокой молекулярной массы. Многообразие структур в различных образцах хитозана чрезвычайно затрудняет сравнение результатов различных исследований, поскольку не в каждом исследовании образцы надлежащим образом характеризуются.

Одна из базовых проблем – неопределённость категорий молекулярной массы хитозана. Границы категорий малой, средней и высокой молекулярной массы размыты, например, один производитель может называть выпускаемый им хитозан хитозаном малой молекулярной массы, в то время, как другой производитель называет аналогичное вещество хитозаном средней молекулярной массы. Для олигосахаридов в химии существует относительно устоявшееся правило, по которому олигомерами называются соединения, включающие от двух до десяти мономеров, а вещества, включающие свыше десяти мономеров, называются полимерами. Однако, для хитозана это правило зачастую не соблюдается и можно увидеть работы, в которых к олигохитозану причисляют соединения с куда большим числом мономеров. В целях унификации обозначений, в данном обзоре предполагается, что олигохитозанами будут называться соединения с молекулярной массой не более 16 кДа. Это соответствует примерно 100 мономерным единицам 100% деацетилированного хитозана. Второе обычно используемое различие – хитозан с высокой, средней и низкой молекулярной массой. В данном обзоре за низкомолекулярный хитозан будут приниматься молекулы с массой от 16 до 190 кДа, за хитозан средней молекулярной массы – от 190 кДа до 300 кДа, а молекулы с массой выше 300 кДа будут обозначаться, как высокомолекулярные хитозаны.

Следует принимать во внимание, что данное деление хитозана и его производных по молекулярной массе не носит исчерпывающего характера и не претендует на экспериментальное обоснование. Данные границы молекулярного веса дублируют таковые в работе Verlee и соавторов, посвящённой химическому производному хитозана, выбраны исключительно с учётом обозначения молекулярных масс, используемых в цитируемых публикациях, и используются для удобства изложения материала [37].

Для сравнения различных образцов хитозана отклонение молекулярных масс должно быть минимальным, особенно при работе с низкомолекулярным хитозаном. Также и разница в степени деацетилирования не должна превышать 1–5%, поскольку это может привести к различным показателям биологической активности. Данные литературы подтверждают вариабельность биологической активности хитозана в зависимости от молекулярной массы.

Так, в работе Поповой и соавторов сравнивалась противомикробная активность хитозана со степенью деацетилирования 85% и молекулярной массой от 3 до 150 кДа в отношении грамположительных (*B. polytuxa*) и грамотрицательных (*P. syringae*, *E. carotovora*) бактерий, а также грибковых (*F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* и *P. recondita*) патогенов растений. Оценка противомикробной активности проводилась диффузионным методом. В результате исследования было установлено, что наибольшей активностью обладали образцы с низкой молекулярной массой (10 и 50 кДа), а при повышении и понижении молекулярной массы активность хитозана снижалась. При этом оценка противогрибковой активности в отношении *P. recondita* проводилась не диффузионным методом, а в модели заражения растений в грунте, однако тенденция к снижению активности при повышении молекулярной массы более чем до 50 кДа сохранялась. Это позволяет исключить вклад малой скорости диффузии высокомолекулярных образцов в снижение их активности, по крайней мере, в отношении данного патогена [38].

Помимо собственных данных, авторы вышеописанной работы во введении приводят чрезвычайно ценные примеры исследований, показывающих противоположные выводы двух групп исследователей о том, высокая или низкая молекулярная масса хитозана обеспечивают большую противомикробную активность против грамположительных бактерий. В первой работе показано, что антимикробный эффект хитозана в отношении усиливался в ряду от олигосахаридов до образцов с молекулярной массой 628 кДа. Бицидное действие высокомолекулярного хитозана объясняется тем, что увеличение количества аминокислотных групп способствует более прочному связыванию полимера с поверхностными структурами клетки, что может уменьшить скорость диффузии питательных веществ, в которых нуждается микробная клетка [39]. Авторы второй работы описывают противопо-

ложный эффект, а именно, более высокую антибактериальную активность образцов с массой менее 10 кДа. Бицидное действие олигохитозана авторы работы связывают с тем, что он обладает большей проникающей способностью через клеточную стенку бактерий, нарушает их функционирование, влияя на физиологические внутриклеточные процессы, что приводит клетку к гибели [40]. Опираясь на уже рассмотренные в данном обзоре нюансы получения хитозана, можно предположить, что различная активность в описанных работах могла быть также связана с другими особенностями, такими как его источник.

Также существуют данные, указывающие на различную тропность наночастиц, полученных из хитозана с различной молекулярной массой, к тканям почки у лабораторных животных. При этом наибольшую тропность демонстрировали образцы с наименьшей молекулярной массой [41]. Следует обратить внимание на то, что авторы данной работы предпочли не определять молекулярную массу хитозана в единицах массы, а указали только показатели вязкости, которые имеют, как было продемонстрировано ранее, лишь частичную связь с реальным размером молекулы хитозана.

В работе Hattori и Ishihara приводятся данные по агрегации форменных элементов крови при помощи хитозана с различной молекулярной массой и степенью деацетилирования. При этом олигомеры не способны вызвать агрегацию крови, а среди полимерных соединений наилучшие результаты были получены при применении хитозана с молекулярной массой 8,6 кДа и выше [42]. Также авторами было отмечено, что слишком высокие концентрации, напротив, препятствуют агрегации форменных элементов, а также что хитозан с достаточно высокой молекулярной массой и степенью деацетилирования способен вызывать агрегацию не только форменных элементов, но и протеинов в тромбоцитарной плазме.

Тап и соавторы в своей работе проанализировали связь между молекулярной массой хитозана и его противоопухолевой активностью в отношении клеток линий A549 и WiDr. В ходе исследования было установлено, что цитотоксические дозы хитозана низкой и средней молекулярной массы, а также хитозана из кутикулы подёнок для опухолевых клеток вдвое ниже, нежели для фибробластов линии L929. Вместе с тем, для хитозана высокой молекулярной массы такой терапевтический ин-

тервал не был подтверждён [43]. В данной работе авторами была охарактеризована молекулярная масса хитозана из подёнок, который был самостоятельно получен авторами. Однако границы молекулярной массы коммерчески полученного хитозана из панцирей креветок, который был использован для сравнения, не указаны.

В работе Niu и соавторов было изучено влияние перорального применения хитозана различной массы (от 3 до 200 кДа) на гистопатологические изменения в модели колита у мышей. Было продемонстрировано, что эффективность хитозана в предотвращении повреждений тканей кишечника увеличивается с повышением молекулярной массы [44].

Проблема неполной характеристики образцов наносит серьёзный ущерб возможности практического медицинского применения результатов исследований хитозана, что было подчёркнуто, например, в работе Ю.М. Васильева, посвящённой возможности включения хитозана в состав вакцин [45].

Различия по источникам получения

Поскольку, как уже было сказано ранее, хитозан можно выделять из очень большого числа источников, определение его происхождения является важным для дальнейшего анализа результатов. В этом разделе данного обзора будут рассмотрены примеры сравнения свойств хитозана, полученного из различных источников. При этом рассмотрены будут только работы, авторы которых перед сравнением биологической активности либо самостоятельно заготавливали хитозан из различных источников, либо полноценно охарактеризовали его происхождение.

Luo и соавторы проводили исследование, в котором сравнивали физико-химические, морфологические и реологические свойства хитозана, полученного из панцирей креветок, а также их четырёх различных видов насекомых [46]. Источниками выступили сброшенные при линьке панцири цикад, коконы шелкопряда, мучные черви и кузнечики. Экстракция хитозана из материала проводилась одинаково для всех образцов и включала обеззараживание спиртом, декальцификацию и депротенинизацию 1M растворами соляной кислоты и гидроксида натрия соответственно. Депротенинизированные образцы обесцвечивали 2% раствором перманганата калия, после чего деацетилировали хитин, выдерживая его в 60% растворе гидроксида натрия в течение 8 часов.

В ходе исследования были получены следующие результаты. Способность к связыванию воды и полярных растворителей у хитозана, выделенного из насекомых, изменялась не однонаправленно. Так, у хитозана, полученного из панцирей цикад, оба этих показателя были достоверно выше, а у хитозана, полученного из кузнечиков – ниже, нежели у хитозана из панцирей креветок. Вязкость хитозана, полученного из всех образцов насекомых, была значительно (до четырёх раз) ниже хитозана из панцирей креветок. Степень кристаллизации, определённая методом рентгенодифракционного анализа, у всех образцов также была ниже, чем у хитозана из панцирей креветок, причём в случае хитозана из коконов шелкопряда снижение достигало более чем 20%.

Подобные данные о различных свойствах хитозана, выделенного из различных источников, были получены и другими авторами.

Так, Ghormade et al., описывая в своей работе выгоды использования хитозана, полученного из различных видов грибов, также представляют сводные данные о степени его деацетилирования. Эти данные свидетельствуют, что возможности деацетилирования хитозана из различных источников неодинаковы, и для различных видов грибов этот показатель может варьироваться от 70 до 94% [47]. Поскольку физико-химические свойства хитозана напрямую способны отражаться на его биологической активности, можно небезосновательно предположить, что биологическая активность продуктов, описанных в упомянутой работе, также неодинакова.

В обзоре Jones et al. авторы также приводят доводы за и против использования хитозана, полученного из грибов, равно как и его комплекса с бета-глюканом, который также является компонентом клеточной стенки. Среди прочего, авторами приводятся данные исследования, в котором проводилась сравнительная оценка хитозана из панцирей ракообразных (один вид креветок, омаров и лангустов, а также два вида крабов) и хитозана из мицелия трёх видов плесневых грибов. Исследование проводилось в модели раны у крыс и выявило существенные (более чем в два раза) различия в эффективности заживления ран под воздействием покрытия на основе хитозана ракообразных. Различия в эффективности хитозана грибов также были достоверными, хотя и не такими яркими. При этом в обеих группах присутствовали образцы, значительно превосходившие контрольный метод лечения [48].

Наджи и соавторы проводили сравнительное исследование хитозана, полученного из панцирей креветок и крабов, а также раковин каракатицы [49]. Уже на этапе получения хитина были обнаружены различия в степени ацетилирования и кристаллизации, при этом оба показателя были ниже у образцов бета-хитина, полученных из когти каракатицы. После окончательного получения хитозана было продемонстрировано, что низкая степень деацетилирования у образцов, полученных из каракатиц, сохраняется, но при этом их степень кристаллизации оказывается выше таковой у образцов, полученных из ракообразных. Это свидетельствует о том, что различия в физико-химических свойствах различных форм хитина носят не только количественный, но и качественный характер. Вязкость хитозана также значительно варьировала, и разница в вязкости между хитозаном из каракатиц и хитозаном из креветок достигала семнадцати раз.

Полученные авторами вышеприведённых исследований результаты убедительно свидетельствуют о различиях в физико-химических свойствах хитозана, выделенного из различных источников. Различия в физико-химических свойствах, в свою очередь, согласно данным литературы, могут влиять на биологическую активность и, например, скорость биodeградации хитозана. Таким образом, некоторые различия в биологических свойствах хитозана, представленные в различных публикациях, могут быть обусловлены его различным происхождением.

К сожалению, существует не слишком много работ, непосредственно посвящённых сравнительному анализу хитозана из различных источников, и некоторые из них являются компиляциями исследований, проведённых в различных лабораториях другими авторами, что ставит под сомнение уже другие нюансы происхождения хитозана – такие как, например, метод экстракции.

Заключение

Хитозан – эффективный во многих отношениях и чрезвычайно перспективный материал, полный потенциал которого научному сообществу ещё только предстоит оценить. Тем не менее, уже имеющийся существенный массив экспериментальных данных вскрывает проблемы, возникающие при сравнении результатов исследований, которые вызваны вариативностью свойств хитозана, зависящих от таких параметров, как источник и технология его получения, а также от его физико-химических свойств. Несмотря на это, можно с уверенностью за-

явить, что подобная гибкость свойств материала с биомедицинским применением является не недостатком, а достоинством, и при должном подходе её можно использовать для решения широкого спектра проблем.

Авторы работы выражают надежду, что представленные в настоящем обзоре сведения об особенностях получения и характеристики хитозана мотивируют будущих исследователей в данной области более подробно охарактеризовывать объекты своих исследований и тем самым повысить воспроизводимость их результатов.

Партнёр проекта – ООО Диаэм.

Работа выполнена в рамках гранта Губернатора Алтайского края в форме субсидий для разработки качественно новых технологий, создания инновационных продуктов и услуг в сферах переработки и производства пищевых продуктов, фармацевтического производства и биотехнологий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации по теме «Разработка технологии получения биологически активного культурального клеточного матрикса» (соглашение №5 от 12 апреля 2022 года).

Список литературы

1. Kaya M., Lelešius E., Nagrockaitė R., Sargin I., Arslan G., Mol A., Baran T., Can E., Bitim B. Differentiations of chitin content and surface morphologies of chitins extracted from male and female grasshopper species. *PLoS one*. 2015. V. 10. No. 1. P. e0115531. DOI: 10.1371/journal.pone.0115531.
2. Jang M.K., Kong B.G., Jeong Y.I., Lee C.H., Nah J.W. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2004. V. 42. No. 14. P. 3423-3432. DOI: 10.1002/pola.20176.
3. Gortari M.C., Hours R.A. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: a mini-review. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2013. V. 16. No. 3. P. 14-14. DOI: 10.2225/vol16-issue3-fulltext-10.
4. Kandra P., Challa M.M., Kalangi Padma Jyothi H. Efficient use of shrimp waste: present and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012. V. 93. No. 1. P. 17-29. DOI: 10.1007/s00253-011-3651-2.
5. Younes I., Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine drugs*. 2015. V. 13. No. 3. P. 1133-1174. DOI: 10.3390/md13031133.
6. Минаков Д.В., Верещагин А.Л., Мороженко Ю.В., Базарнова Н.Г. Хитозан-глюкановые комплексы высших грибов: выделение, идентификация и определение некоторых свойств // *Химия растительного сырья*. 2019. № 1. С. 251-257. DOI: 10.14258/jcpr.2019014368.
7. Dhillon G.S., Kaur S., Brar S.K., Verma M. Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. *Critical reviews in biotechnology*. 2013. V. 33. No. 4. P. 379-403. DOI:10.3109/07388551.2012.717217.
8. Zhang Y., Zhou X., Ji L., Du X., Sang Q., Chen F. Preparation and biological activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica*. *Carbohydrate polymers*. 2008. V. 72. No. 3. P. 419-423. DOI:10.1016/j.carbpol.2007.09.010.

9. Nemtsev S.V., Zueva O.Y., Khismatullin M.R., Albulov A.I., Varlamov V.P. Isolation of chitin and chitosan from honeybees. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2004. V. 40. No. 1. P. 39-43. DOI:10.1023/B:ABIM.0000010349.62620.49.
10. Khayrova A., Lopatin S., Varlamov V. Obtaining chitin, chitosan and their melanin complexes from insects. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. V. 167. P. 1319-1328. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.086.
11. Mohan K., Ganesan A. R., Muralisankar T., Jayakumar R., Sathishkumar P., Uthayakumar V., Chandrasekar R., Revathi N. Recent insights into the extraction, characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects. *Trends in food science & technology*. 2020. V. 105. P. 17-42. DOI:10.1016/j.tifs.2020.08.016.
12. Krishnan S., Chakraborty K., Dhara S. Biomedical potential of β -chitosan from cuttlebone of cephalopods. *Carbohydrate Polymers*. 2021. V. 273. P. 118591. DOI: 0.1016/j.carbpol.2021.118591.
13. Yang T., Jia Z., Chen H., Deng Z., Liu W., Chen L., Li L. Mechanical design of the highly porous cuttlebone: A bioceramic hard buoyancy tank for cuttlefish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020. V. 117. No. 38. P. 23450-23459. DOI: 10.1073/pnas.2009531117.
14. Sebastian J., Rouissi T., Brar S. K., Hegde K., Verma M. Microwave-assisted extraction of chitosan from *Rhizopus oryzae* NRRL 1526 biomass. *Carbohydrate polymers*. 2019. V. 219. P. 431-440. DOI:10.1016/j.carbpol.2019.05.047.
15. Boudouaia N., Bengharez Z., Jellali S. Preparation and characterization of chitosan extracted from shrimp shells waste and chitosan film: application for Eriochrome black T removal from aqueous solutions. *Applied Water Science*. 2019. V. 9. No. 4. P. 1-12. DOI: 10.1007/s13201-019-0967-z.
16. Younes I., Hajji, S., Frachet V., Rinaudo M., Jeloulou K., Nasri M. Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014. V. 69. P. 489-498. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.013.
17. Kong M., Chen X. G., Xing K., Park H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*. 2010. V. 144. No. 1. P. 51-63. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012.
18. Hamdine M., Heuzey M. C., Bégin A. Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels. *International journal of biological macromolecules*. 2005. V. 37. No. 3. P. 134-142. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2005.09.009.
19. Malaise S., Rami L., Montembault A., Alcouffe P., Burdin B., Bordenave L., Delmond S., David L. Bioresorption mechanisms of chitosan physical hydrogels: a scanning electron microscopy study. *Materials Science and Engineering: C*. 2014. V. 42. P. 374-384. DOI: 10.1016/j.msec.2014.04.060.
20. Harmsen R.A.G., Tuveng T.R., Antonsen S.G., Eijsink V.G.H., Sørli M. Can we make chitosan by enzymatic deacetylation of chitin? *Molecules*. 2019. V. 24. No. 21. P. 3862. DOI: 10.3390/molecules24213862.
21. Notario-Pérez F., Martín-Illana A., Cazorla-Luna R., Ruiz-Caro, R., Veiga M.D. Applications of Chitosan in Surgical and Post-Surgical Materials. *Marine Drugs*. 2022. V. 20. No. 6. P. 396. DOI: 10.3390/md20060396.
22. Willbold E., Wellmann M., Welke B., Angrisani N., Gniesmer S., Kampmann A., Hoffmann A., de Cassan D., Menzel H., Hoheisel A.L., Glasmacher B., Reifenrath J. Possibilities and limitations of electrospun chitosan-coated polycaprolactone grafts for rotator cuff tear repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2020. V. 14. No. 1. P. 186-197. DOI: 10.1002/term.2985.
23. Lv Y., Chen X., Wang Q., Wang Y., Zhang J., Liu C., Yu L. Synthesis and characterization of chitosan-based biomaterials modified with different active groups and their relationship with cytotoxicity. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* 2007. V. 22. No. 4. P. 695-700. DOI: 10.1007/s11595-006-4695-5.
24. Narvaez-Flores J. J., Vilar-Pineda G., Acosta-Torres L.S., Garcia-Contreras R. Cytotoxic and anti-inflammatory effects of chitosan and hemostatic gelatin in oral cell culture. *Acta Odontol. Latinoam.* 2021. V. 99. P. 98-103. DOI: 10.54589/ao1.34/2/098.
25. Altinel Y., Chung S.S., Okay G., Uğraş N., Işık A.F., Öztürk E., Özgüç H. Effect of chitosan coating on surgical sutures to strengthen the colonic anastomosis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2018. V. 24. No. 5. P. 405-411. DOI: 10.5505/tjtes.2018.59280.
26. Farhadhosseinabadi B., Zarebkohan A., Eftekhary M., Heiat M., Moosazadeh Moghaddam M., Gholipourmalekabadi M. Crosstalk between chitosan and cell signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019. V. 76. No. 14. P. 2697-2718. DOI: 10.1007/s00018-019-03107-3
27. Loi F., Córdova L.A., Pajarinen J., Lin T. H., Yao Z., Goodman S. B. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. 2016. V. 86. P. 119-130. DOI: 10.1016/j.bone.2016.02.020.
28. Griffin D.R., Archang M.M., Kuan C.H., Weaver W.M., Weinstein J.S., Feng A.C., Ruccia A., Sideris E., Ragkousis V., Koh J., Plikus M.V., Di Carlo D., Segura T., Scumpia P. O. Activating an adaptive immune response from a hydrogel scaffold imparts regenerative wound healing. *Nature materials*. 2021. V. 20. No. 4. P. 560-569. DOI: 10.1038/s41563-020-00844-w.
29. Chung L., Maestas D.R., Jr, Housseau F., Elisseff J.H. Key players in the immune response to biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews*. 2017. V. 114. P. 184-192. DOI: 10.1016/j.addr.2017.07.006.
30. Yang D., Xiao J., Wang B., Li L., Kong X., Liao J. The immune reaction and degradation fate of scaffold in cartilage/bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2019. V. 104. P. 109927. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109927.
31. Echeverria Molina M.I., Malollari K.G., Komvopoulos K. Design challenges in polymeric scaffolds for tissue engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021. P. 231. DOI:10.3389/fbioe.2021.617141.
32. Matica A., Menghiu G., Ostafe V. Biodegradability of chitosan based products. *New Frontiers in Chemistry*. 2017. V. 26. No. 1.
33. Basa S., Nampally M., Honorato T., Das S.N., Podile A.R., El Gueddari N.E., Moerschbacher B.M. The pattern of acetylation defines the priming activity of chitosan tetramers. *Journal of the American Chemical Society*. 2020. V. 142. No. 4. P. 1975-1986. DOI: 10.1021/jacs.9b11466.
34. Weinhold M.X., Sauvageau J.C., Kumirska J., Thöming J. Studies on acetylation patterns of different chitosan preparations. *Carbohydrate polymers*. 2009. V. 78. No. 4. P. 678-684. DOI:10.1016/j.carbpol.2009.06.001.
35. Dobrovolskaya I.P., Popryaduhin P.V., Yudin V.E., Ivanova E.M., Yukina G.U., Yudenko A.N., Smirnova N.V. Biore-sorbable properties of chitosan fibers in endomysium and perimysium muscle tissue. *Tsitologiya*. 2016. V. 58. No. 6. P. 460-466.
36. Ratanavaraporn J., Kanokpanont S., Tabata Y., Damrongsakkul S. Modulation of in vitro attachment, proliferation and osteogenic differentiation of rat bone-marrow-derived stem cells using different molecular mass chitosans and their blends with gelatin. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2010. V. 21. No. 8-9. P. 979-996. DOI: 10.1163/156856209X461043.
37. Verlee A., Mincke S., Stevens C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate polymers*. 2017. V. 164. P. 268-283. DOI:10.1016/j.carbpol.2017.02.001.
38. Попова Э.В., Коваленко Н.М., Тютюрев С.Л., Домнина Н.С., Колесников Л.Е., Борисова Е.А. Биологическая активность хитозана с разной молекулярной массой // *Вестник защиты растений*. 2017. № 3 (93). С. 28-33.
39. Fernandes J.C., Eaton P., Gomes A.M., Pintado M.E., Malcata F.X. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation. *Ultramicroscopy*. 2009. V. 109. No. 8. P. 854-860. DOI: 10.1016/j.ultramicro.2009.03.015.

40. Vishu Kumar A.B., Varadaraj M.C., Gowda L.R., Tharanathan R.N. Low molecular weight chitosans – Preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2007. V. 1770. No. 4. P. 495-505. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.12.003.
41. Kandav G., Bhatt D. C., Singh S. K. Effect of Different Molecular Weights of Chitosan on Formulation and Evaluation of Allopurinol-Loaded Nanoparticles for Kidney Targeting and in Management of Hyperuricemic Nephrolithiasis. *AAPS PharmSciTech*. 2022. V. 23. No. 5. P. 1-12. DOI: 10.1208/s12249-022-02297-7.
42. Hattori H., Ishihara M. Changes in blood aggregation with differences in molecular weight and degree of deacetylation of chitosan. *Biomedical materials*. 2015. V. 10. No. 1. P. 015014. DOI: 10.1088/1748-6041/10/1/015014.
43. Tan G., Kaya M., Tevlek A., Sargin I., Baran T. Antitumor activity of chitosan from mayfly with comparison to commercially available low, medium and high molecular weight chitosans. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 2018. V. 54. No. 5. P. 366-374. DOI: 10.1007/s11626-018-0244-8.
44. Niu W., Dong Y., Fu Z., Lv J., Wang L., Zhang, Z., Huo J., Ju J. Effects of molecular weight of chitosan on anti-inflammatory activity and modulation of intestinal microflora in an ulcerative colitis model. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. V. 193. P. 1927-1936. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.024.
45. Vasiliev Y. M. Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation. *Expert review of vaccines*. 2015. V. 14. No. 1. P. 37-53. DOI: 10.1586/14760584.2015.956729.
46. Luo Q., Wang Y., Han Q., Ji L., Zhang H., Fei Z., Wang Y. Comparison of the physicochemical, rheological, and morphologic properties of chitosan from four insects. *Carbohydrate Polymers*. 2019. V. 209. P. 266-275. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.01.030
47. Ghormade V., Pathan E.K., Deshpande M.V. Can fungi compete with marine sources for chitosan production? *International journal of biological macromolecules*. 2017. V. 104. P. 1415-1421. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112.
48. Jones M., Kujundzic M., John S., Bismarck A. Crab vs. Mushroom: A review of crustacean and fungal chitin in wound treatment. *Marine Drugs*. 2020. V. 18. No. 1. P. 64. DOI: 10.3390/md18010064.
49. Hajji S., Younes I., Ghorbel-Bellaaj O., Hajji R., Ri-naudo M., Nasri M., Jellouli K. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International journal of biological macromolecules*. 2014. V. 65. P. 298-306. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.045