

**В.Н. Хабаров, П.Л. Иванов**

**БИОМЕДИЦИНСКОЕ  
ПРИМЕНЕНИЕ  
ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ  
И ЕЕ ХИМИЧЕСКИ  
МОДИФИЦИРОВАННЫХ  
ПРОИЗВОДНЫХ**

**Под общей редакцией В.Н. Хабарова**



**Москва**  
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»  
2020

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений .....	5
Введение .....	7
<b>Глава 1. Структура, функции, способы получения гиалуроновой кислоты (краткий обзор).....</b>	<b>13</b>
<b>Глава 2. Структурная трансформация гиалуронана.....</b>	<b>28</b>
2.1. Химическая модификация полисахаридной макромолекулы ( <i>в соавторстве с д-ром хим. наук Н.Н. Сигаевой</i> ).....	28
2.1.1. Химическая конъюгация.....	28
2.1.2. Химическое сшивание.....	39
2.2. Физические методы стимулирования химических превращений гиалуронана .....	66
2.2.1. Фотосенсибилизированные реакции сшивания.....	67
2.2.2. Радиационно-химическая модификация.....	75
<b>Глава 3. Гиалуроновая кислота в биоинженерии и регенеративной медицине .....</b>	<b>92</b>
3.1. Имплантаты в виде бесклеточных 3D-структур .....	93
3.2. Гибридные имплантаты с клеточными структурами .....	98
3.3. Инъекционные гиалуронансодержащие микроимплантаты и наногелевые структуры .....	101
<b>Глава 4. Гиалуронансодержащие препараты для антираковой терапии и диагностики .....</b>	<b>123</b>
4.1. Мишени для гиалуронансодержащих препаратов.....	123
4.2. Средства доставки токсичных субстанций к раковым клеткам.....	127
4.3. Гиалуронан в структуре противораковых эпигенетических лекарств .....	132
4.4. Гиалуронан в радиотерапии онкозаболеваний .....	139
<b>Глава 5. «Золотой стандарт» в эстетической медицине .....</b>	<b>156</b>
5.1. Инъекционная контурная пластика .....	156
5.1.1. Малоинвазивная косметологическая коррекция с помощью безоболочечных микроимплантатов (дермальных филлеров) .....	156
5.1.1.1. Филлеры как индукторы неоколлагенеза .....	162
5.1.2. Объемная контурная коррекция имплантатами гиалуроновой кислоты.....	164

5.2. Биоревитализация кожи моно- и комплексными препаратами гиалуронана . . . . .	167
5.3. Инъекционные препараты на основе гиалуронана, зарегистрированные на территории Российской Федерации . . . . .	169
5.4. Оценка эффективности косметологической коррекции инволюционных изменений кожи гиалуроновыми препаратами . . . . .	182
<b>Глава 6. Применение гиалуроновой кислоты в офтальмологии . . . . .</b>	<b>195</b>
<b>Глава 7. Гиалуроновая кислота в лечении заболеваний суставов. . . . .</b>	<b>206</b>
7.1. Некоторые особенности суставных патологий . . . . .	207
7.1.1. Физико-химические и функциональные свойства гиалуронана в синовиальной полости. . . . .	211
7.2. Современное состояние терапии суставных патологий гиалуроновыми гидрогелями в Европе и США. . . . .	212
7.3. Препараты гиалуронана для лечения артропатий, зарегистрированные в РФ. . . . .	217
7.4. Возможные механизмы действия гиалуронана в лечении патологий синовиальных суставов . . . . .	228
<b>Глава 8. Гиалуронан в ветеринарии . . . . .</b>	<b>235</b>
<b>Глава 9. Другие области медицинского применения гиалуроновой кислоты . . . . .</b>	<b>248</b>
9.1. Иммунология. . . . .	248
9.1.1. Роль низкомолекулярного гиалуронана. . . . .	248
9.1.2. Роль высокомолекулярного гиалуронана. . . . .	252
9.1.3. Гиалуронан в диабетических патологиях. . . . .	254
9.2. Гинекология и урология ( <i>в соавторстве с канд. мед. наук А.С. Пермяковым</i> ) . . . . .	255
9.3. Стоматология. . . . .	258
9.4. Роль гиалуронана в заживлении ран и язв . . . . .	264
9.5. Пульмонология и ринология . . . . .	270
9.6. Гиалуронан в диетологии. . . . .	272
<b>Заключение. . . . .</b>	<b>284</b>

## Глава 2

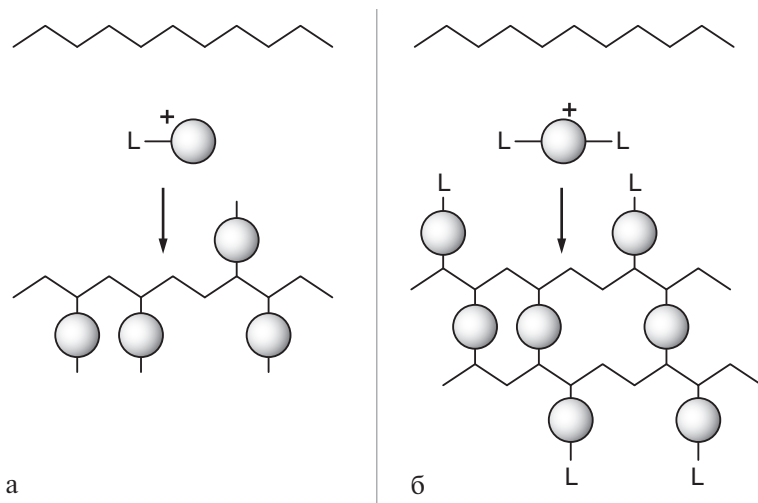
# СТРУКТУРНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ГИАЛУРОНАНА

### 2.1. ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИСАХАРИДНОЙ МАКРОМОЛЕКУЛЫ

Гидрогели на основе нативной ГК не обладают жесткостью и ферментативной устойчивостью, достаточными для их использования в качестве замены мягких, хрящевых или костных тканей, то есть для применения в различных областях реконструктивной медицины. Именно поэтому за многие годы были разработаны, и разрабатываются по сей день, различные условия для проведения реакций сшивания (так называемый кросслинкинг) и конъюгации полисахаридных макромолекул. Конъюгация и сшивание основаны на одних и тех же химических реакциях. Отличие заключается только в том, что в первом случае соединение прививается на одну цепь полисахаридной макромолекулы, тогда как во втором — разные цепи связываются между собой двумя связями или более (рис. 2.1), при этом различают прямое сшивание и сшивание различных производных гиалуронана. Известны химические и физические типы модификаций для создания гидрогелей с различной степенью вязкости и жесткости (в соединении с другими материалами) (Schante, 2011; Larrañeta et al., 2018; Chen Y. et al., 2016; Khunmanee et al., 2017; Feng et al., 2017; Freudenberg et al., 2016; Хабаров, 2016). Химические методы на данное время преобладают, поскольку позволяют создавать более стабильные к ферментативной деградации структуры.

#### 2.1.1. Химическая конъюгация

В модификации гиалуронана могут быть задействованы четыре химически активных центра полисахаридной макромолекулы — ацетамидные, карбоксильные, гидроксильные группы и восстановленные



**Рис. 2.1.** Схема модификаций гиалуроновой кислоты: а — химическая конъюгация; б — химическое шивание

концевые группы, доступные для взаимодействия с различными реагентами.

Первоначально рассмотрим химическую модификацию карбоксильных групп, так как известно, что карбоксильные группы полисахарида являются сайтами распознавания для рецепторов гиалуронана и гиалуронидазы, поэтому химическая модификация по данным группам меняет биологическое поведение биополимера в организме (Oh et al., 2010; Banerji et al., 2007).

#### **А. Реакции амидирования**

Реакция амидирования широко применяется для введения аминогрупп в макромолекулу гиалуронана. Амидирование в воде с помощью карбодиимидов является одним из наиболее широко используемых методов модификации ГК, применяемых преимущественно благодаря растворимости в воде карбодиимида (КДИ) — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. В работе (Danishefsky, Siskovic, 1971) впервые была проведена реакция трансформации карбоксильных групп полисахаридов, включая гиалуронан, в амидные. Механизм данной реакции был подробно изучен Nakajima и Ikada (1995). Первой стадией реакции является активация карбоксильных групп с помощью КДИ, которая приводит к образованию интермедиата O-ацил-

изомочевины. Вторая стадия — нуклеофильная атака амином активированной ГК, что ведет к образованию амидной связи (рис. 2.2). Степень модификации полимера составляла 38,6%. Данная реакция очень сильно зависит от значений pH среды, которые на разных стадиях должны отличаться. Так, активацию гиалуронана с помощью КДИ лучше проводить в кислой среде (pH = 3,5–4,5), а вторую стадию с образованием амида — в щелочной, в условиях депротонирования амина. В щелочной среде КДИ быстро гидролизует, и амидирование не происходит.

Замена диаминов на дигидразиды, которые имеют более низкие значения  $pK_a = 2-3$ , дает возможность получить более высокие значения степени модификации продукта — до 56% (Pouyani, Prestwich, 1994; Oh et al., 2008; Kim et al., 2008). При добавлении большого избытка дигидрида адипиновой кислоты (ДАП) наблюдается функционализация гиалуронана по карбоксильным группам с образованием дигидразидных связей (рис. 2.3). Конъюгат ГК–ДАП способен образовывать гидронозные связи с кетонами и альдегидами, а также ацилгидразиды с ацилирующими агентами, что позволяет его использовать при дальнейшем сшивании или получении конъюгированных лекарственных соединений либо полипептидов, например, конъюгат ГК–Таксол\* — перспективный препарат для лечения онкологических заболеваний (Luo et al., 2000).

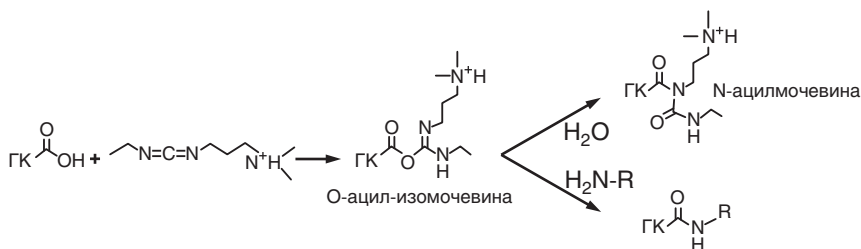


Рис. 2.2. Модификация гиалуронана диамином в присутствии карбодимиды

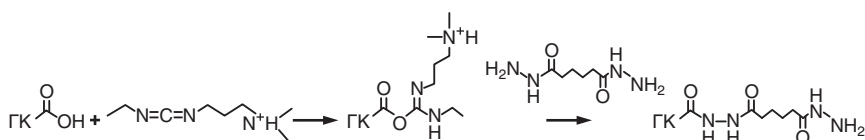


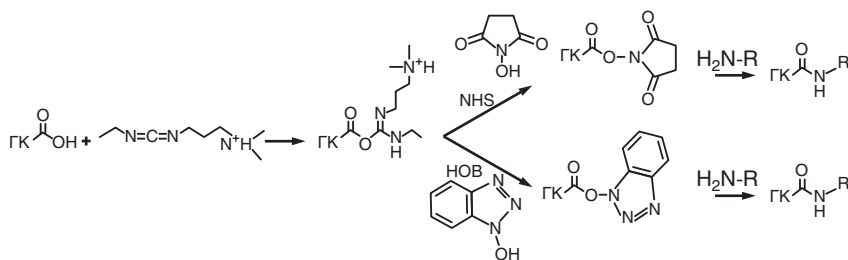
Рис. 2.3. Модификация гиалуронана дигидразидом в присутствии карбодимиды

В целях предотвращения образования побочного продукта N-ацил-мочевины в работе (Bulpitt, Aeschlimann, 1999) использовали N-гидроксисукцинимид (NHS) или 1-гидроксibenзотриазол (HOBt) в присутствии КДИ, которые образуют более устойчивые к гидролизу интермедиаты. NHS или HOBt реагирует с O-ацил-изомочевинной, далее активированная ГК подвергается нуклеофильной атаке амином (рис. 2.4). Использование HOBt при этом приводит к более высоким степеням модификации по сравнению с NHS.

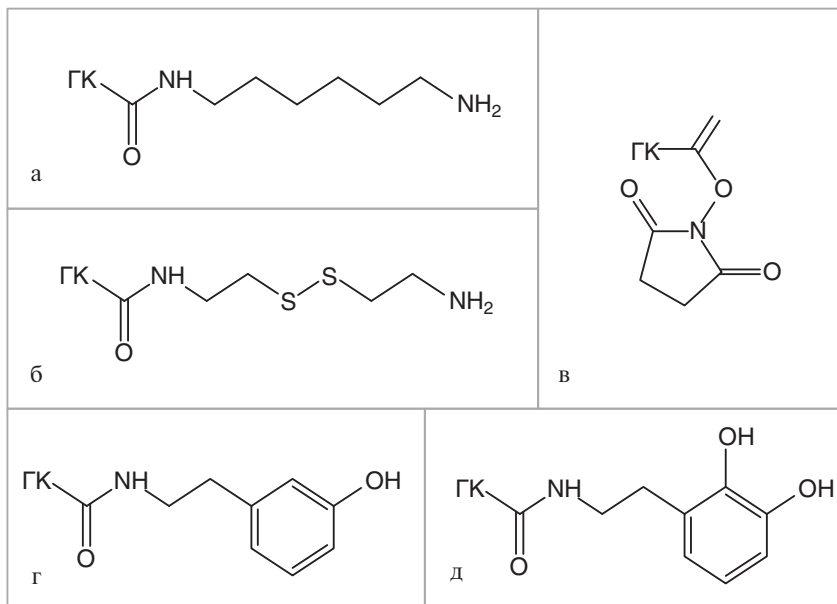
Исследования, посвященные взаимодействию гиалуронана с фармакологически значимыми ароматическими аминокислотами: 5-аминосалициловой, 4-аминосалициловой, антраниловой и п-аминобензойной кислотами в водной среде в присутствии КДИ — представлены в работах Понеделькиной и соавт. (2008), Понеделькиной и Одинокова (2009). Получены модифицированные гликаны, содержащие 9–43% акриламидных и 10–33% изоуреидокарбонильных групп, в зависимости от природы аминокислоты. С помощью боргидридного восстановления изоуреидокарбонильные группы конвертированы в гидроксиметильные.

С помощью реакции амидирования КДИ к гиалуронану были привиты гексаметилендиамин, цистамин (Oh et al., 2010; Oh et al., 2008) и N-гидроксисукцинимид (Hyung et al., 2008) (рис. 2.5). Получены конъюгаты ГК с тирамином (Lee et al., 2009) и допамином (Lee et al., 2008).

Помимо КДИ, активирующим карбоксильные группы ГК реагентом является иодид 2-хлор-1-метилпиридиния (ХМП) (Magnani et al., 2000). Реакция модификации проводится в безводном диметилформамиде в целях минимизации гидролиза ХМП. Натриевую соль гиалуронана сначала переводят в соль тетрабутиламмония, чтобы обеспечить ее солюбилизацию в органическом растворителе. ХМП реагирует с



**Рис. 2.4.** Модификация гиалуронана диамином в присутствии карбодимида, NHS и HOBt

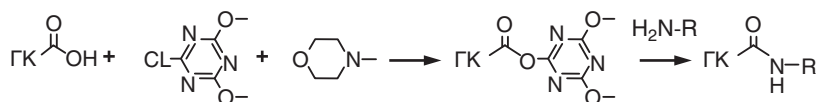


**Рис. 2.5.** Конъюгаты гиалуронана: а — с гексаметилендиамином; б — цистамином; в — N-гидроксиsuccинимидом; г — тирамином; д — допамином

карбоксильными группами гиалуронана, образуя промежуточное соединение пиридиния с высвобождением хлорид-ионов, которые нейтрализуются тетрабутиламмонием. Затем нуклеофильный диамин реагирует с образованием амидных связей. Триэтиламин нейтрализует высвобождаемый иодид. Недостатком этого метода является необходимость использования органического растворителя, который требует более длительного процесса очистки и дополнительной стадии получения соли ГК–ТВА. Однако такой метод очень эффективен, поскольку расходуется небольшое количество реагентов по сравнению с описанными выше методами модификации в присутствии КДИ.

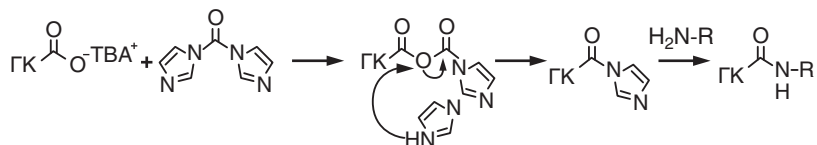
Амидирование гиалуронана с использованием другого активирующего агента — 2-хлордиметокси-1,3,5-триазина (ХДМТ) описано в работе Bergman et al. (2007). Для оптимальной солюбилизации реагентов реакцию проводят в смешанном растворителе вода–ацетонитрил (3:2). ХДМТ реагирует с карбоксильными группами. Далее к раствору смеси добавляют N-метилморфолиний для нейтрализации хлорид-ионов, а ГК реагирует с амином с образованием амидной связи (рис. 2.6).





**Рис. 2.6.** Модификация диамином в присутствии 2-хлордиметокси-1,3,5-триазины и N-метилморфолина

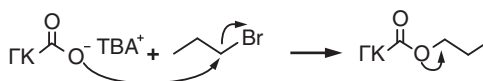
Амидирование ГК в присутствии 1,1'-карбонилдиимидазола в качестве активирующего агента карбоксильных групп проводят в ДМСО, используя соль ГК–ТВА. Карбонилдиимидазол взаимодействует с гиалуронатом с образованием высокоактивного промежуточного соединения, которое, в свою очередь, реагирует с диамином с образованием амидной связи (рис. 2.7). Реакция образования промежуточного соединения имидазола занимает 12 ч, а реакция амидирования — 48 ч. Однако преимуществом данной реакции является нетоксичность побочных продуктов ( $\text{CO}_2$  и имидазол).



**Рис. 2.7.** Модификация диамином в присутствии 1,1'-карбонилдиимидазола

### Б. Реакция этерификации (образование сложных эфиров)

Запатентована реакция этерификации карбоксильных групп путем алкилирования алкилгалогенидами (рис. 2.8), включая бромиды и иодиды (Della Valle, Romeo, 2008). Процесс протекает в течение 12 ч при 30 °С.



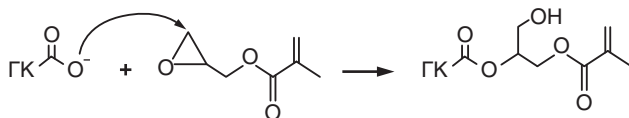
**Рис. 2.8.** Конъюгат гиалуронана с алкилбромидом

Этерификация ГК в присутствии диазометана проводилась в органическом растворителе ДМСО с использованием соли ГК–ТВА (Jeanloz, Forchielli, 1950). В работе (Hirano et al., 2005) описано получение метилового эфира гиалуронана при использовании триметилсилилдиазометана как агента, активирующего карбоксильные группы (рис. 2.9).



**Рис. 2.9.** Конъюгат гиалуронана с триметилсилилдиазометаном

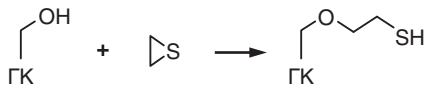
Как следует из данных работ (Bencherif et al., 2008), взаимодействие с глицидилметакрилатом приводит к образованию метакрилированной ГК. Реакция проводится в воде в присутствии избытка триэтиламина в качестве катализатора (рис. 2.10). Предполагается, что реакция протекает в основном по карбоксильным группам, а вторичная трансэтерификация гидроксильных групп обратима.



**Рис. 2.10.** Модификация с образованием конъюгата глицидилметакрилата гиалуроновой кислоты

### В. Реакции с участием гидроксильных групп

Разработан метод сульфатирования гидроксильных групп гиалуронана при использовании этиленсульфида (тиирана) (Serban et al., 2008). Кольцо этиленсульфида раскрывается за счет нуклеофильной атаки гидроксильных групп (рис. 2.11) под действием дитиотрептола. Реакция проводится сначала в течение 12 ч при pH = 10, затем после добавления дитиотрептола 24 ч при pH = 8,5. Показано, что привитые тиольные группы, неспособные к дальнейшей сшивке, играют роль радикального акцептора, который защищает клетки от радикалов кислорода.



**Рис. 2.11.** Модификация гиалуронана этиленсульфидом

Описан способ прививки активированного ацилхлоридом карбоксилатного соединения на гидроксильные группы (Pravata et al., 2008) с образованием сложноэфирных связей (рис. 2.12). Карбоксильные группы ГК сначала активировали хлорацилированием тионилхлоридом и подвергали взаимодействию при комнатной температуре в органическом растворителе. В своем исследовании авторы использовали этот

метод для прививки олигомеров полимолочной кислоты. Когда реакцию проводили в органическом растворителе ДМСО, ГК предварительно превращали в соль цетилтриметиламмонийбромида.

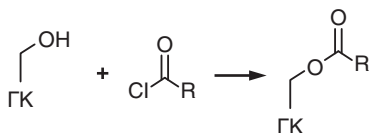


Рис. 2.12. Модификация гиалуронана ацилхлоридом

Бромацетат ГК со степенью модификации 18% синтезирован в водном растворе с использованием избытка бромуксусного ангидрида (Serban, Prestwich, 2007). Реакция происходит по более реакционноспособным первичным 6-гидроксигруппам остатков N-ацетилглюкозамина.

ГК с тиол-активными группами может быть получена (рис. 2.13) конъюгацией с цистамином и последующим восстановлением дитиотреитолом (Lee et al., 2016) или конъюгацией с 3-(2-пиридилдитио)пропионилгидразидом или иодацетамидом (Burdick et al., 2005).

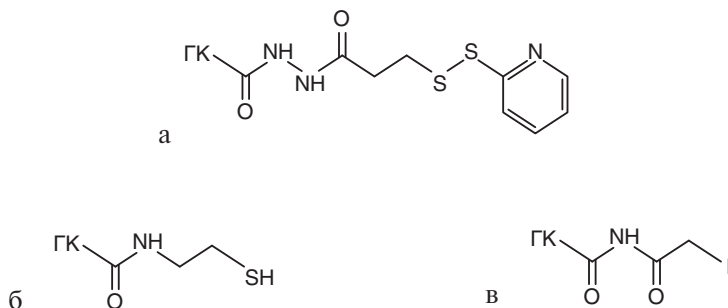


Рис. 2.13. Конъюгаты гиалуронана: а — с 3-(2-пиридилдитио)пропионилгидразидом; б — цистамином с последующим восстановлением дитиотреитолом; в — иодацетамидом

Синтез модифицированной ГК с использованием цианогенбромида для активации гидроксильных групп описан в работах Mišochová et al. (2006), Chytil, Rekař (2009). При этом образуется активированный цианатный эфир, который реагирует с амином с образованием в основном N-замещенных карбаматных связей и вторичного продукта изомоче-

вины гиалуронана (рис. 2.14). Преимуществом этой реакции является использование водной среды. Высокие степени модификации (до 80%) достигаются за счет введения лишь небольшого избытка реагентов в течение всего 1 ч. Однако для проведения реакции требуется высокое значение pH среды (до 10), что приводит к уменьшению молекулярной массы гиалуронана.

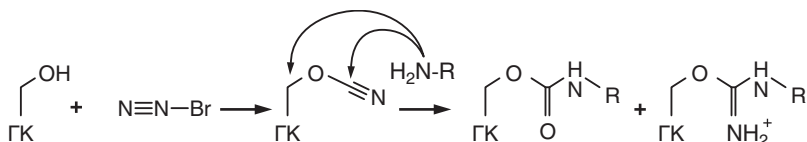


Рис. 2.14. Модификация гиалуронана цианогенбромидом

Полученное производное подвергалось реакции с аминоэтилметакрилатом, аминопропилметакриламидом (Oh et al., 2008) или винилсульфоном (Hiemstra et al., 2007) при использовании гексафторфосфата бензотриазол-1-илокси-трис(диметиламино)фосфония в ДМСО (рис. 2.15).

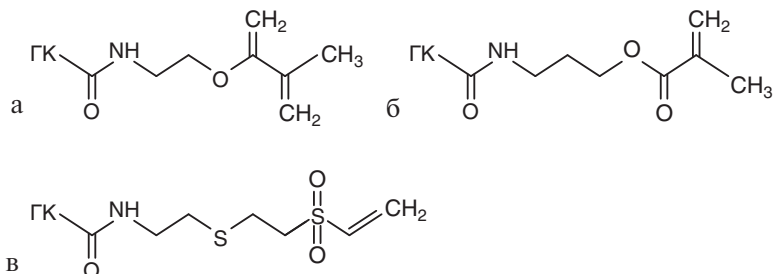


Рис. 2.15. Конъюгаты гиалуронана и аминоэтилметакрилата (а), аминопропилметакриламида (б), винилсульфона (в)

Этерификация ГК метакриловым ангидридом (рис. 2.16) описана в работах Nahn et al. (2007), Burdick et al. (2005). Процесс ведется в ледяной воде в течение 12 ч при pH = 8–10.

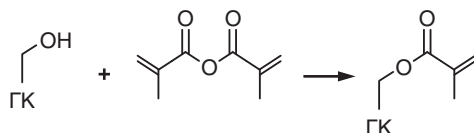


Рис. 2.16. Модификация гиалуронана метакриловым ангидридом

Запатентована реакция модификации гиалуронана с использованием октенил-янтарного ангидрида, которая протекает в щелочной среде ( $\text{pH} = 9$ ) (Тоemmeraas, Eenschooten, 2007). Гидроксильные группы в структуре ГК реагируют с ангидридом с образованием сложноэфирных связей (рис. 2.17). Авторы работы (Eenschooten et al., 2010) оптимизировали параметры реакции, получив продукт со степенью модификации 43%, используя 50-кратный избыток ангидрида.

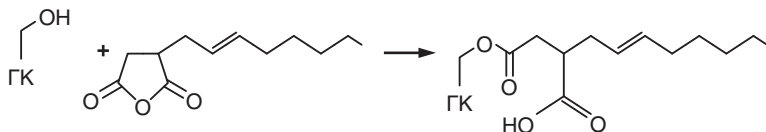


Рис. 2.17. Модификация октенил-янтарным ангидридом

В работе Mlbochov et al. (2007) получены растворимые в воде продукты модификации полисахарида 2-алкилоксиметилоксираном в щелочной среде (рис. 2.18).

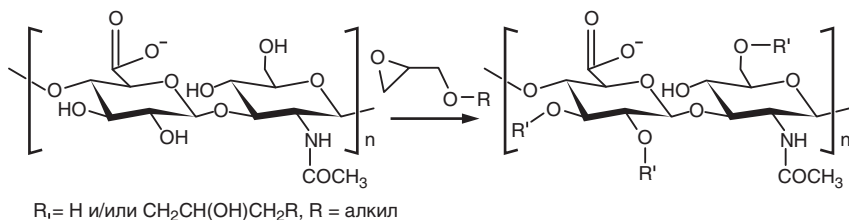


Рис. 2.18. Модификация гиалуронана 2-алкилоксиметилоксираном

Модификация макромолекул периодатом натрия (рис. 2.19) приводит к окислению vicinalных гидроксильных групп гиалуронана до альдегидных с раскрытием сахаридного кольца (Вильданова и др., 2016; Vil'Danova et al., 2014; Ossipov, Piskounova, 2008; Yeo et al., 2006). Показано существенное уменьшение молекулярной массы биополимера в зависимости от времени проведения реакции.

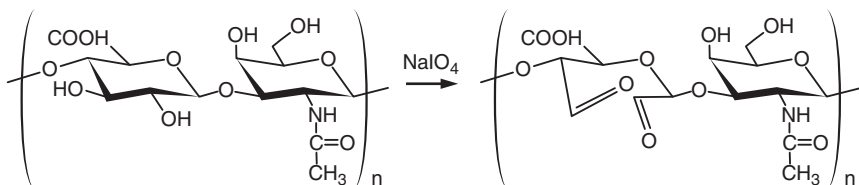


Рис. 2.19. Модификация полисахарида периодатом натрия

Данный метод был использован для прививки пептидов (рис. 2.20) на альдегидные группы (Glass et al., 1996) или для сшивания с гидразидом с образованием носителя для бупивакаина.

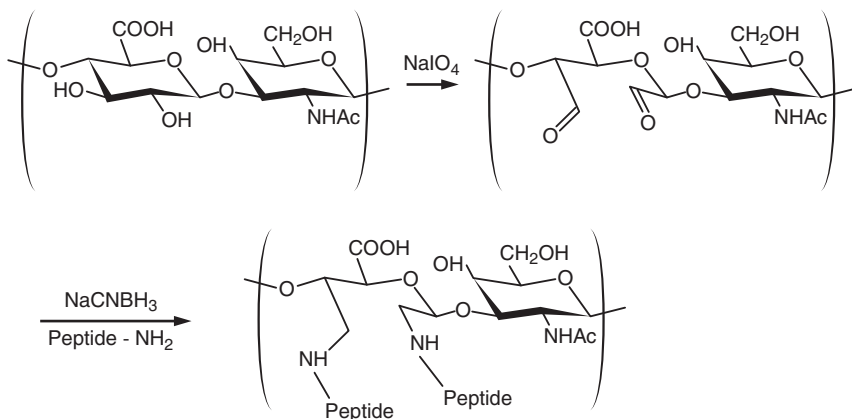
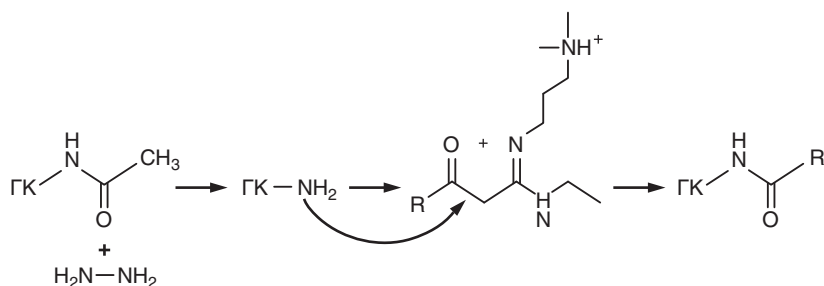


Рис. 2.20. Прививка пептида к гиалуронану

### Г. Реакции с участием ацетамидных групп

Деацетилирование ацетамидных групп ведет к восстановлению аминогрупп, которые далее способны взаимодействовать с кислотой, используя описанные выше методы амидирования. Crescenzi et al. (2002), Vulpitt, Aeschlimann (1999) в своих работах использовали более мягкие условия реакции, однако деградация цепи посредством  $\beta$ -элиминирования глюконовой части также имела место. Деацетилирование N-ацетамидных групп гиалуронана приводит к восстановлению аминогрупп, которые могут реагировать с кислотами при использовании методик амидации (рис. 2.21). Обычно деацетилирование проводят при взаимодействии с гидразинсульфатом в течение 5 сут при  $55\text{ }^\circ\text{C}$  (Collins, Birkinshaw, 2013). На основе деацетилированных производных ГК проводят ее дальнейшее сшивание различными реагентами.

Исследована возможность получения конъюгатов на основе деацетилированной ГК и 5-фторурацила (5-ФУ) (Wada, Chirachanchai, 1994). К раствору 5-ФУ в диметилформамиде добавляли  $\text{NaOH}$ , затем этиленкарбонат. Синтезированный продукт, 1-(2-гидроксиэтил)-5-фторурацил, растворяли в тетрагидрофуране и обрабатывали N, N'-карбонилдимидазолом. Полученный 2-(5-фторурацил-1-ил)этил-



**Рис. 2.21.** Модификация гиалуронана гидразином через стадию образования деацетилизованного производного

O-имидазолид подвергали взаимодействию с деацетилизованной кислотой в диметилформамиде при 40 °С в течение 3 дней. Содержание 5-ФУ составило порядка 14%.

### 2.1.2. Химическое сшивание

Наличие свободных гидроксильных групп в строении ГК обеспечивает возможность структурного преобразования сахаридного основания, что позволяет проводить реакцию сшивания, например, с помощью бифункциональных реагентов, взаимодействующих одновременно с двумя функциональными группами, принадлежащими соседним макромолекулам. К бифункциональным реагентам относят химические соединения, содержащие две, обычно одинаковые, пространственно разделенные реакционноспособные группировки. Бифункциональные реагенты широко используются для ковалентного сшивания пространственно сближенных участков полисахаридной макромолекулы. Полученные подобным образом сшитые гиалуроновые гидрогели приобретают ряд ценных свойств, что позволяет существенно расширить область их медицинского применения.

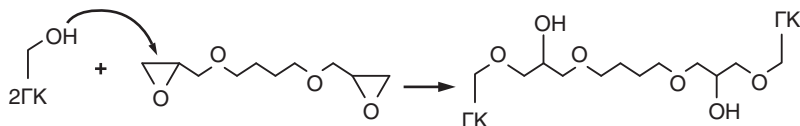
В водном растворе ГК образует гелеобразные структуры в результате межмолекулярного взаимодействия линейных макромолекул. В коллоидной химии гели определяются как структурированные системы с жидкой дисперсионной средой, которые проявляют механические свойства, в большей или меньшей степени подобные свойствам твердых тел. Частицы дисперсной фазы, соединенные между собой в пространственную сетку, которая содержит в своих ячейках дисперсионную среду (воду в случае гидрогелей), лишают систему текучести. Вполне очевидно, что свойства гидрогелей по большей части зависят от

прочности связей и степени ретикуляции в перекрестно сшитой структуре. Поперечные шивки в биополимерах разделяют на физические, образованные в результате электростатического взаимодействия или водородных связей, и химические (ковалентные связи). В физических гелях при нагревании происходит разрушение узлов сетки, и это приводит к уменьшению модуля сдвига. Химически сшитые гели значительно более устойчивы к нагреванию, но при высоких температурах происходит полное необратимое разрушение химической структуры геля. Уровень перекрестного сшивания определяется средней молекулярной массой полимерной цепи, расположенной между шивками. Плотность поперечных шивок напрямую влияет на фундаментальные свойства гидрогелей, такие как степень набухания, механическая прочность и эластичность, проницаемость, диффузионные характеристики (Хабаров и др., 2012). Гидрогели, образованные гиалуронаном в результате поперечного сшивания, являются амфифильными полимерными субстратами, которые способны набухать в воде и формировать нерастворимую объемную сеть. Сетка полимера остается в равновесии с водным окружением, при этом наблюдается баланс эластичных сил поперечно сшитых полимеров с осмотическими силами раствора. Химический состав и молекулярная масса отрезка макромолекулы между двумя шивками определяют плотность поперечных шивок, которая, в свою очередь, влияет на набухание и величину пор геля. Кроме того, именно перекрестное сшивание характеризует гидрогель как псевдотвердое вещество, а не раствор, и придает ему вязкоэластичные свойства. Природа поперечных шивок влияет на формирование гидрогеля, его форму, размер и деградацию. Для биомедицинского применения гидрогелей необходим контроль образования поперечных шивок. Большинство методов получения гиалуронана с поперечными связями относится к одной из двух схем: одностадийный процесс с бифункциональным реагентом, образующим поперечные мостики, либо двухстадийный процесс, при котором вначале синтезируются высокорекреакционноспособные производные ГК, которые в последующей реакции приводят к образованию поперечных связей между макромолекулярными цепями.

Первыми провели сшивание гиалуронана Laurent, Hellsing и Gelotte в 1964 г. (Laurent et al., 1964). Они использовали 1,2,3,4-диметоксибутан в качестве сшивающего агента и проводили реакцию в щелочных условиях при  $\text{pH} = 13\text{--}14$  (0,2 М NaOH и 0,1% боргидрида натрия) при температуре 50 °С в течение 2 ч. Malson и Lindqvist запатентовали сшивание ГК с использованием бутандиолдиглицидилового эфира (БДДЭ)

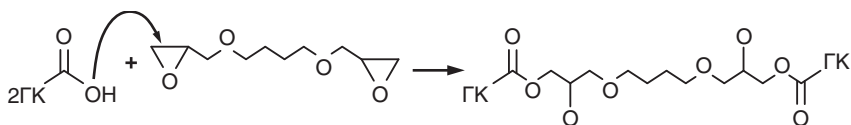


в 0,25 М растворе NaOH (Malson, Lindqvist, 1986). Позже Piron улучшил данную методику, смешав БДДЭ и 0,25 М раствор NaOH перед реакцией для получения более однородного гидрогеля (Piron, Tholin, 2002). Данная реакция протекает с раскрытием эпоксидного кольца и образованием эфирных связей по гидроксильным группам полисахарида (рис. 2.22).



**Рис. 2.22.** Сшивание бутандиолдиглицидиловым эфиром в щелочной среде

Для получения сшитых гелей использовали бисэпоксиды — диглицидиловый эфир этиленгликоля и полиглицидиловый эфир полиглицерина (Yui et al., 1993). Диглицидиловые эфиры алкандиолов являются малотоксичными сшивающими агентами. При высоких значениях pH > 13 гидроксильные группы почти все депротонированы и, следовательно, более нуклеофильны, чем депротонированные карбоксильные группы полисахарида. Именно поэтому эпоксины предпочтительно взаимодействуют с гидроксильными группами с образованием эфирных связей. Однако при значениях pH ниже значения  $pK_a$  гидроксильных групп меньшее количество OH-групп депротонировано и анионные карбоксильные группы являются доминантными, что способствует образованию сложноэфирных связей. Сшивание гиалуронана с использованием БДДЭ в кислых условиях (pH = 2,0–4,5) представлено на рис. 2.23.



**Рис. 2.23.** Сшивание бутандиолдиглицидиловым эфиром в кислой среде

ГК химически сшивали с диглицидиловым эфиром ПЭГ, диэпоксисоединением, в результате чего были получены пленки с низким содержанием воды, медленно разлагающиеся при контакте с водой (Tomihata, Ikada, 1997). Реакцию сшивания проводили в кислых и нейтральных условиях, поскольку эпоксидная группа легко гидролизуеться в щелочной среде. Обнаружено, что самое низкое содержание воды соста-

вило 60 масс.% при набухании в физиологическом растворе (37 °С). Tomihata и Ikada (1997) наблюдали образование эфирных и неэфирных связей даже тогда, когда сшивание проводилось в слабокислых условиях. Вероятно, это связано со значениями pH (4,7; 6,1 и 8), при которых депротонируется большее количество гидроксильных групп, чем при значениях pH ниже 4,5.

Сегодня в промышленности БДЭ чаще всего используется для получения большинства сшитых гиалуроновых гидрогелей. Помимо простоты синтеза таких гидрогелей, продукты их деградации не проявляли цитотоксичности, а эпоксидные соединения гидролизуются до простых диолов (Nishi et al., 1995).

Zhao (2000) запатентовал метод двойного сшивания, основанный на последовательных реакциях эпоксидов сначала в щелочных условиях (pH = 10), затем в кислой среде (pH = 4). В качестве эпоксидов он использовал эпихлоргидрин и 1,2,7,8-диэпоксиоктан.

Получен композитный материал на основе гиалуронана и агарозы при применении эпихлоргидрина в качестве сшивающего агента (Zhang et al., 2012). Показано, что введение ГК в гидрогель агарозы значительно увеличивает размер ячеек, степень набухания и термическую стабильность гидрогеля. Сшитый композитный гидрогель проявлял низкую цитотоксичность *in vitro* и умеренный воспалительный ответ *in vivo*. Авторы установили, что чем больше гиалуронана в композитном гидрогеле, тем больше его скорость деградации. Таким образом, варьирование соотношения «агароза—гиалуронан» позволяет регулировать скорость деградации гидрогеля.

Kim et al. (2012) в своей работе использовали диглицеდიловый эфир этиленгликоля для создания гидрогеля на основе гиалуронана и коллагена для тканевой регенерации.

Сшивание ГК дивинилсульфоном (ДВС) было запатентовано Balazs и Leshchiner (Balazs et al., 2012). Реакция проводилась при высоких значениях pH >13 (0,2 М NaOH) с образованием сульфонил-бис-этильных связей между гидроксильными группами полисахарида (рис. 2.24). Данный способ сшивания имеет преимущество, поскольку реакция протекает при комнатной температуре, что ограничивает деградацию биополимера.

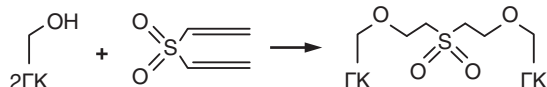


Рис. 2.24. Реакция сшивания гиалуроновой кислоты дивинилсульфоном

Было установлено, что реакция начинается через 5–10 мин после добавления ДВС и заканчивается через 1 ч. Обнаружено, что присутствие солей, таких как NaCl в реакционной среде, увеличивает степень сшивания. Исследования других авторов подтвердили эффективность метода сшивания с помощью ДВС (Collins, Birkinshaw, 2007). Eun et al. (2008) показали, что сшитые гели ГК–ДВС деградировали быстрее, чем гидрогели ГК–АДГ. Несмотря на то что ДВС обладает высокой реакционной способностью и токсичностью, гидрогели ГК–ДВС проявляли биосовместимость, что было подтверждено гистологическим анализом. При использовании ДВС получены также микропористые гидрогели на основе химически стабилизированной ГК и производных целлюлозы, гидроксиэтилцеллюлозы и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) (Sannino et al., 2004). Авторами показано значительное увеличение сорбционной способности такого композитного геля.

В патентах (Balazs et al., 2012) сообщается о методе сшивания полисахарида, основанном на реакции с альдегидами. Реакция формальдегида и гиалуронана при нейтральном pH затрагивает гидроксилы полисахарида, amino- и иминогруппы протеина.

Несколько авторов использовали глутаровый альдегид (ГА) для сшивания гиалуронана (Tomihata, Ikada, 1997). Реакцию сшивания ГА необходимо инициировать в кислой среде (pH = 2), чтобы активировать альдегид. Методом ИК-спектроскопии показано образование полуацетальных связей между гидроксильными группами полисахарида (рис. 2.25). Авторы отмечают, что реакцию можно проводить в среде «ацетон–вода», но не в среде «этанол–вода», что указывает на ингибирование реакции сшивания, вызванной побочной реакцией с гидроксильными группами этанола. Обнаружено, что при использовании ГА образуются продукты с большим количеством поперечных связей (Tomihata, Ikada, 1997), чем в случае применения карбодимидных реакций. Поперечное сшивание ГА использовали в целях получения материалов с высокой устойчивостью к расщеплению. Такие материалы представляют собой вариант гиалуронана с поперечными мостиками, которые в то же время являются более вязкими и эластичными, чем нативная ГК.

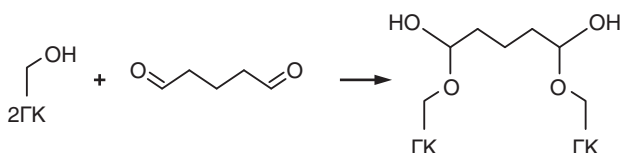


Рис. 2.25. Сшивание глутаровым альдегидом

Получены пленки на основе гиалуронана и итаконовой кислоты, сшитые ГА (Calles et al., 2016). Введение итаконовой кислоты увеличивает адгезию пленок, уменьшает их набухание в воде, в то же время полученный материал отличается хрупкостью.

Гидрогели на основе сукцината хитозана и диальдегида гиалуронана получены Tan et al. (2009). Возможность использования композитного гидрогеля в качестве инъектируемого каркаса была установлена путем инкапсулирования бычьих суставных хондроцитов в композитную гидрогелевую матрицу *in vitro*. Показано, что клетки сохраняют хондроцитарную морфологию, а структура гидрогеля поддерживает их выживаемость.

Кюо et al. (1991) предложили использовать КДИ не как активаторы карбоксильных групп, а как реагенты. Бис-КДИ использовали для сшивания и образования стабильных бис-(N-ацилмочевины) сшитых гелей (рис. 2.26).

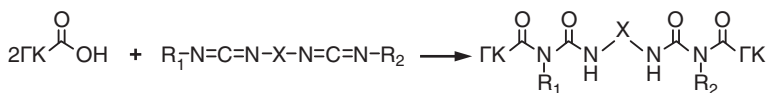
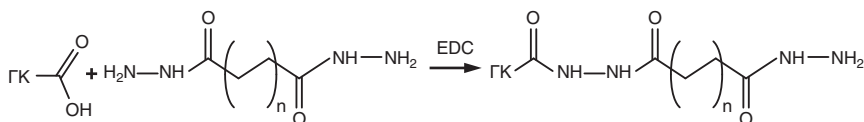


Рис. 2.26. Сшивание гиалуронана бис-карбодимидом

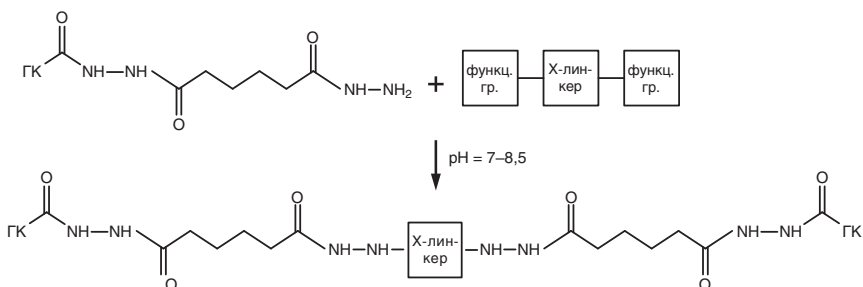
Были успешными попытки применения КДИ для реакции между карбоксильными группами полисахарида и аминами бифункциональных кросслинкеров. Vulpitt и Aeschlimann (1999) в своей работе использовали реакцию КДИ и 1-гидроксibenзотриазола для образования связи между активированными аминами ( $\text{pK}_a < 8,0$ ; например, дигидразид) и карбоксильными группами ГК. Для образования связи между ГК и простыми первичными аминами ( $\text{pK}_a > 9,0$ ; например, дигидрохлорид 1,4-диаминобутана) использовался КДИ и N-гидроксисульфосукцинимид.

Предложена химическая модификация гиалуронана дигидразидом с помощью КДИ (рис. 2.27). Реакция протекает в водной среде в мягких условиях (комнатная температура,  $\text{pH} = 4,75$ ), что позволяет уменьшить деградацию природного полимера. Адипиновый дигидразид использовали как бифункциональный реагент в реакциях нуклеофильного замещения и для последующего проведения поперечной сшивки (Pouyani, Prestwich, 1994).

Модифицированную ГК растворяли в буфере и добавляли гомобифункциональные кросслинкеры (рис. 2.28, 2.29). Они взаимодействуют с гидразид-модифицированной при  $\text{pH} > 5$  и аминомодифицированной кислотой при  $\text{pH} > 8$ . Гелеобразование наблюдалось в течение 30–90 с (Hahn et al., 2007).



**Рис. 2.27.** Сшивание гиалуронана дигидразидами [(EDC — 1-этил-3-(3-диметил-аминопропилкарбодимид)]:  $n = 1$  — янтарный дигидразид,  $n = 2$  — адипиновый дигидразид,  $n = 3$  — субер-дигидразид

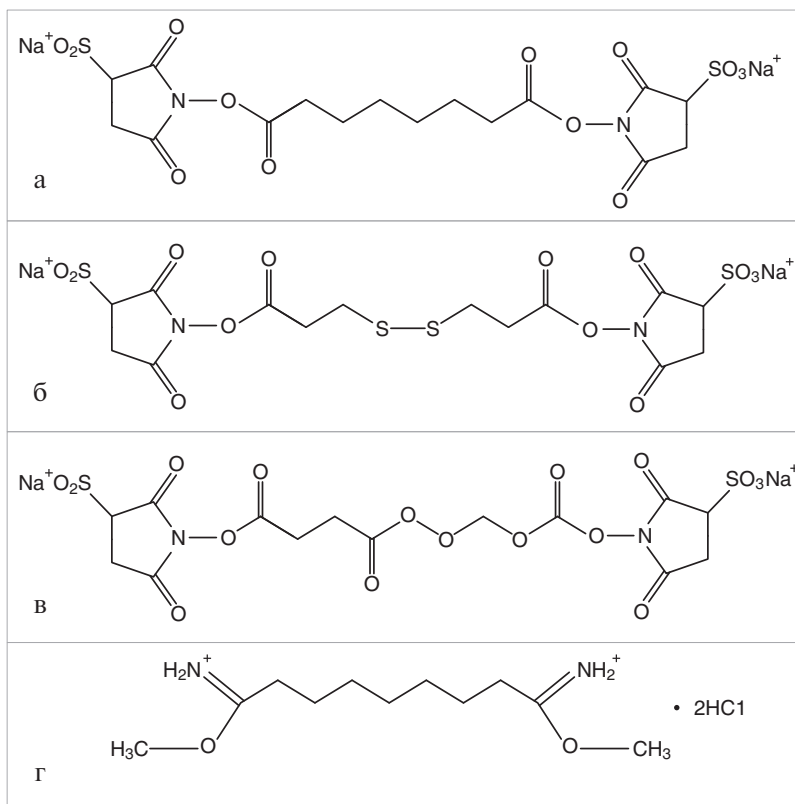


**Рис. 2.28.** Сшивание производных гиалуронана, модифицированных дигидразидами, при помощи гомобифункциональных кросслинкеров (Х-линкер)

Получены поливалентные гидразид-сшитые гидрогели гиалуронана на основе синтезированных ди-, три-, тетра-, пента-, гекса- и полигидразидов. Обнаружено, что при использовании HCl в качестве инициатора реакции гели образуются очень быстро (20–40 с), но затвердевают за 5–30 мин. Гидрогели остаются устойчивыми в кислых средах, но постепенно разрушаются при  $\text{pH} > 7,0$ . Обнаружено, что гидрофобные сшивающие агенты дают наиболее устойчивые гелиевые структуры (Vercruyse et al., 1997).

Гидрогелевая пленка на основе ГК, модифицированной адипиновым дигидразидом, сшитой гомобифункциональным реагентом полиэтиленгликоль-пропиональдегидом, представлена в работе Luo и Kirker (2000). Высушенная пленка увеличивается в объеме в 7 раз при набухании в буфере, достигая равновесного значения набухания менее чем за 100 с. Разработанные пленочные материалы предлагается использовать для контролируемого высвобождения терапевтических агентов на раневых участках.

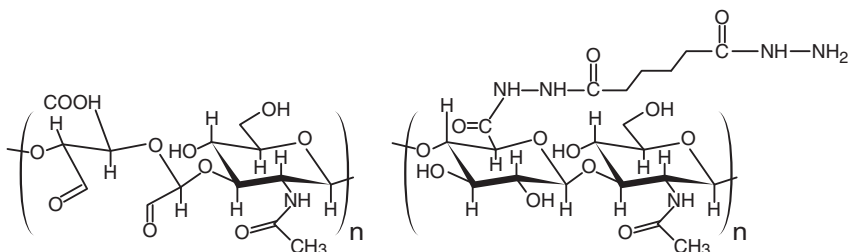
Смешение растворов диальдегида гиалуронана и конъюгата (гидразид + дексаметазон) приводит к формированию сшитого гидрогеля в течение 1 мин. Показано значительное уменьшение объема геля на



**Рис. 2.29.** Гомобифункциональные сшивающие агенты: а — бис-сульфосукцинимидилсебурат (BS3); б — 3,3'-дитиобис-сульфосукцинимидилпропионат (DTSSP); в — этиленгликольбис-сульфосукцинимидилсукцинат (sulfo-EGS); г — дигидрохлориддиметилсульберимидат (DMS)

5-й день после его получения, при этом дексаметазон высвобождался из геля при относительно постоянной скорости в течение первых 3 дней. Полученные гели показали биосовместимость при подкожной инъекции (Ito et al., 2007). Сшитые материалы на основе диальдегида и гидразида ГК использовали в качестве носителей для доставки анестетика бупивакаина. Показано удвоение продолжительности сенсорной нервной блокады при отсутствии увеличения миотоксичности при применении разработанных гелей по сравнению с раствором бупивакаина (Jia et al., 2004).

Схема формирования микрогелей на основе ГК, модифицированной дигидразидными, альдегидными группами методом обратной эмульсии, представлена на рис. 2.30. Такие микрогели более устойчивы к энзимной деградации, практически не токсичны, в отличие от гелей на основе ГК с дигидразидными группами и диальдегида ПЭГ (Jia et al., 2004).



**Рис. 2.30.** Схема формирования микрогелей, модифицированных адипиновым дигидразидом

Создан новый класс гидрогелевых материалов, содержащих гидрогелевые частицы гиалуронана, ковалентно связанные со вторичной сетью (Jha et al., 2009). Гидрогелевые частицы синтезировали методом мицеллярной полимеризации. ГК предварительно модифицировали окислением периодатом натрия, которое приводило не только к появлению альдегидных групп, но и к уменьшению среднего размера частиц. Альдегидные группы использовались в качестве активных групп для дальнейшего сшивания с производными гиалуронана, содержащими гидразидные группы. В результате полученные макроскопические гидрогели содержали две сети: одну — без индивидуальных частиц, другую — со вставленными отдельными частицами (рис. 2.31). Первый гель получен путем прямого смешивания производных гиалуронана. Основная сеть находится между прочно сшитыми частицами полисахарида, а вторичная сеть формируется на поверхности гелевых частиц (Jha et al., 2009).

Методом обратной эмульсии на основе ГК, содержащей дигидразидные и альдегидные группы, получены биосовместимые микрогели (Jia et al., 2006). Новые биосовместимые нетоксичные дермальные филлеры получены на основе гидрогелей гиалуронана и гексаметилендиамина (Yeom et al., 2010), в результате чего образуются амидные связи (рис. 2.32).

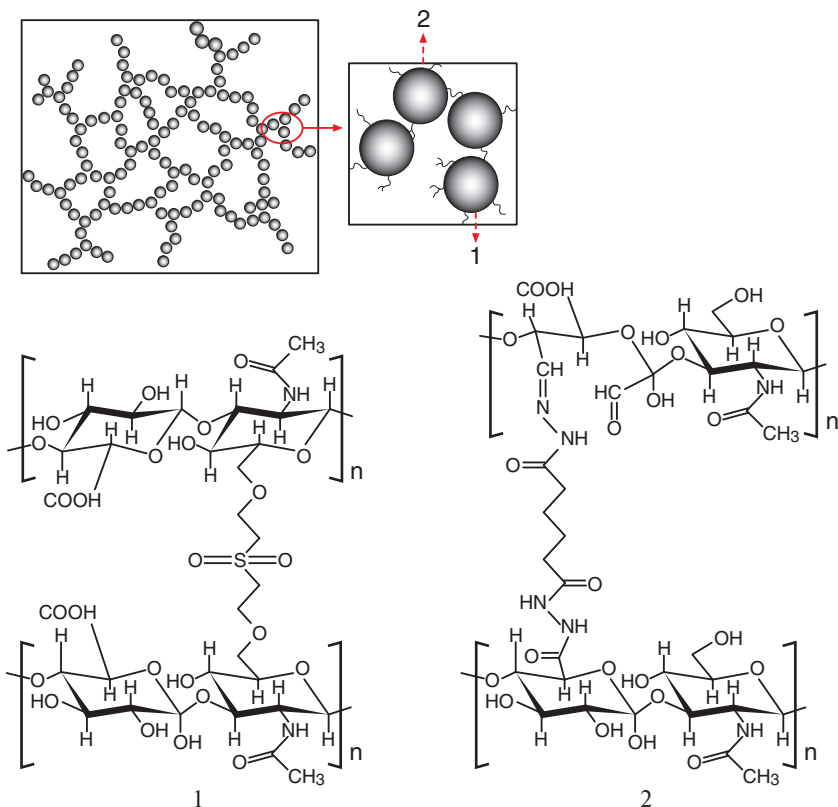


Рис. 2.31. Схема дважды сшитых гелей с (1) внутренней и (2) внешней шшивкой

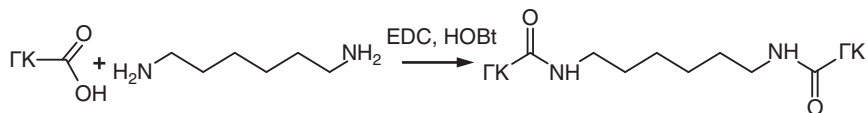
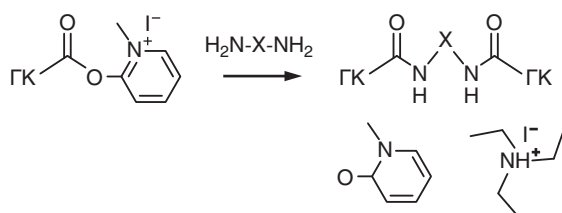


Рис. 2.32. Сшивание гиалуронана и гексаметилендиамина после активации 1-этил-3-(3-(диметиламино)пропил)карбодиимидом и 1-гидоксибензотриазола моногидратом

Использование хлор-1-метилпиридиния иодида в карбодиимидной реакции для сшивания полисахарида приведено в работе Magnani et al. (2000). Сначала хлор-1-метилпиридиния иодид реагирует с карбоксильными группами гиалуронана, образуя промежуточное соединение



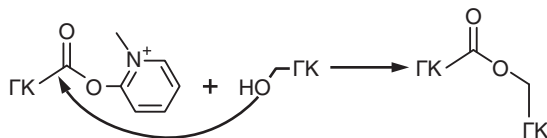
пиридиния с высвобождением хлорид-иона, который нейтрализуется тетрабутиламмонием. Затем нуклеофильный диамин атакует активированную ГК с образованием амидной связи (рис. 2.33). Триэтиламин нейтрализует высвобождаемые иодид-ионы. Недостатком этого метода является необходимость использования органического растворителя. Показано, что степень сшивания близка к теоретическому значению, это указывает на практически полное использование реактива. Данный метод очень эффективен, поскольку для его реализации необходимо небольшое количество реагентов.



**Рис. 2.33.** Сшивание гиалуронана, активированного хлор-1-метилпиридиния иодидом, с помощью диаминов

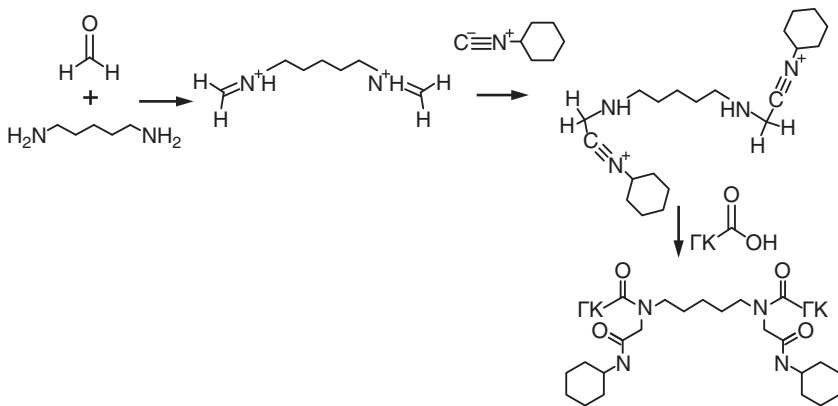
Если в реакционную смесь с хлор-1-метилпиридиния иодидом в карбодиимидной реакции не добавлять амин, то происходит этерификация гидроксильных групп. Активированная таким образом ГК реагирует со своими гидроксильными группами, образуя сшивку между цепями через сложноэфирную группу (рис. 2.34). Такие гели называются автосшитыми гелями. Реакция проводится в растворителе ДМСО. Однако эта реакция протекает не так быстро, как амидирование, поскольку гидроксильные группы являются менее нуклеофильными, чем аминогруппы. Активированные карбоксильные группы могут взаимодействовать с неактивированными карбоксильными группами, но полученный неустойчивый ангидрид затем реагирует с гидроксильными группами с образованием также сложноэфирной связи. Уникальная особенность автосшивки по сравнению с другими методами сшивания заключается в том, что между сшитыми цепями полисахарида нет ионных мостиков. Таким образом, во время их деградации в организме высвобождаются только продукты распада гиалуронана.

В работе Young et al. (2004) показано, что сшитые гидрогели этого типа более жесткие и устойчивые к ферментативной деградации *in vitro* по сравнению с гидрогелями, полученными при использовании КДИ.



**Рис. 2.34.** Сшивание гиалуронана, активированного хлор-1-метилпиридиния иодидом, с нативным полисахаридом

В работах Schante et al. (2011), Crescenzi et al. (2003) в качестве сшивающего агента для образования диамидных связей между полисахаридными цепями используется диамин. Реакцию проводят в водных растворах при  $\text{pH} = 3$  в присутствии формальдегида, циклогексилизоцианида. Прежде всего, диамин конденсируется с формальдегидом с образованием протонированного диимина, который далее реагирует с циклогексилизоцианидом. Затем карбоксильные группы ГК взаимодействуют с активированным цианидным промежуточным соединением с образованием амидной связи (рис. 2.35). Однако использование формальдегида, который, как известно, является канцерогеном, требует особого обращения.



**Рис. 2.35.** Сшивание гиалуронана с использованием реакции конденсации

Исследованы реакции сшивания гиалуронана алкилированием с применением тозилатной активации (Huin-Amargier et al., 2006). Реакция протекает с образованием сложного эфира с использованием тетраэтиленгликоля, функционализированного двумя тозилатными группами (рис. 2.36). Реакцию проводят в ДМСО и соли тетрабутиламмонийной ГК.

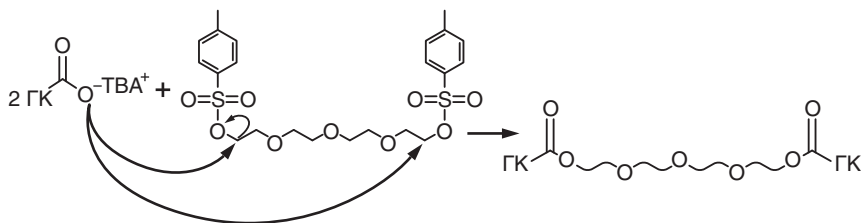


Рис. 2.36. Реакция сшивания с использованием метода тозилатной активации

Дисульфид-сшитые гидрогели получены из тиол-модифицированной ГК. Сначала синтезировали дитиобис-пропановый дигидразид и дитиобис-масляный дигидразид и связывали с гиалуронатом посредством реакции с КДИ (Shu et al., 2002). Затем дисульфидные связи образованного гидрогеля редуцировались дитиотреитолом, давая соответствующие тиол-модифицированные производные (рис. 2.37).

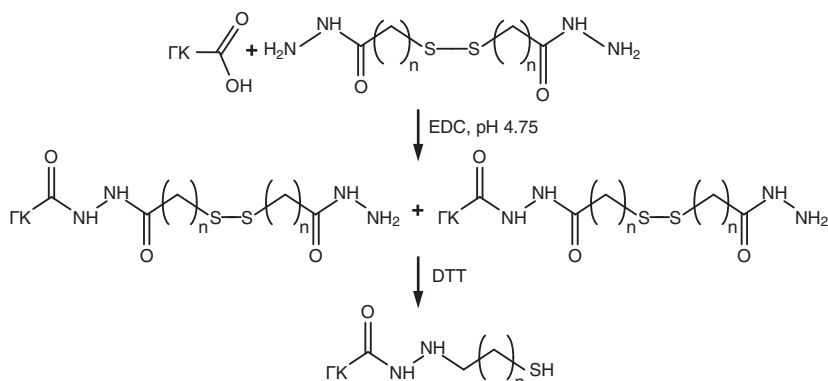


Рис. 2.37. Получение тиол-модифицированной гиалуроновой кислоты (DTT — дитиотреитол)

Гидрогели формировались в мягких условиях окислением на воздухе тиольных групп до дисульфидных (рис. 2.38). Данный тип реакции интересен тем, что не требует введения синтетических кросслинкеров.

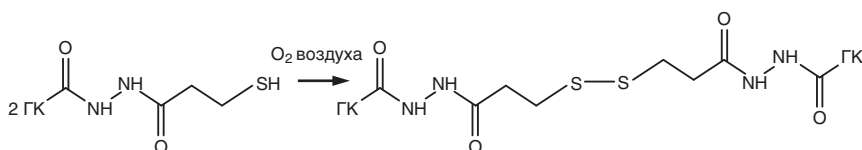
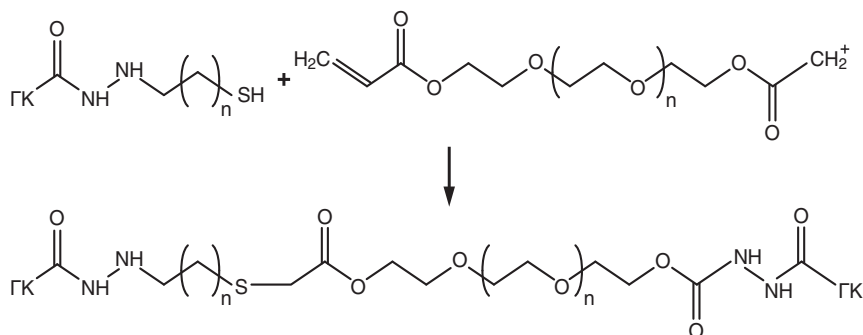


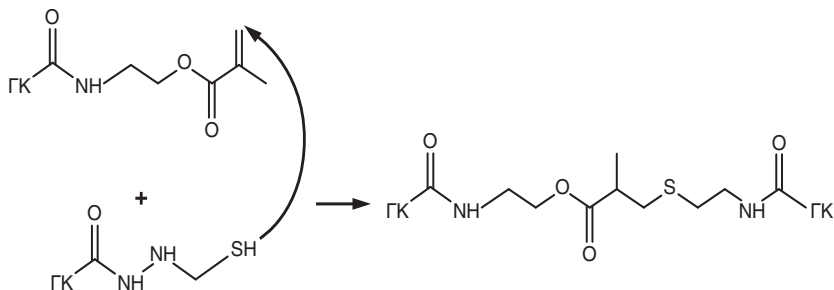
Рис. 2.38. Сшивание тиол-модифицированной гиалуроновой кислоты

В работе (Shu et al., 2002) сообщается о получении сшитых гидрогелей тиол-модифицированной ГК и диакрилата ПЭГ (рис. 2.39). Время гелеобразования находится в диапазоне от 2 до 6 мин.



**Рис. 2.39.** Сшивание гиалуроновой кислоты, модифицированной тиольными группами, с помощью диакрилата полиэтиленгликоля

Описано образование гидрогеля при взаимодействии двойных связей конъюгата аминоэтилметакрилата — ГК или метакриламида аминопропила — ГК и тиольных групп ГК (ГК—цистамин) (Oh et al., 2010). При этом не требуется использование дополнительных реагентов, а в результате реакции не образуются токсичные побочные продукты, что делает данный метод подходящим для получения гидрогелей *in situ* (рис. 2.40).

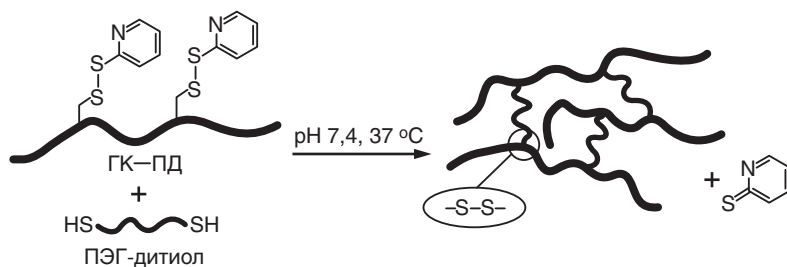


**Рис. 2.40.** *In situ* сшивание гиалуроновой кислоты, модифицированной аминоэтилметакрилатом, и конъюгата гиалуроновая кислота — цистамин

С помощью тиол-дисульфидной реакции обмена были синтезированы инъеклируемые гидрогели биополимера с дисульфидными связями (рис. 2.41). Реологические тесты показали, что гидрогели формируются в течение минуты при 37 °С. Сначала синтезировали производное гиалуронана, содержащее пиридилдитиол, которое реагировало с дитиоловым кросслинкером, образуя гидрогели (Choh et al., 2011).

В результате реакции ковалентного присоединения цистамина к макромолекуле гиалуронана появлялись тиольные группы (Skardal et al., 2010). После сушки некоторые биополимерные материалы в виде пленки дополнительно сшивали перекисью водорода. Показано, что биополимерные пленки с низкой степенью сшивания растворялись в искусственной слезной жидкости в течение нескольких минут, тогда как сильно сшитые структуры были стабильны более недели. Дополнительное сшивание перекисью водорода приводило к образованию пленок с более низким поглощением воды. Высвобождение *in vitro* модельных препаратов диклофенака и бычьего сывороточного альбумина завершалось через 2–3 ч.

Одной из наиболее изученных реакций для получения гидрогелей гиалуронана является реакция присоединения по Михаэлю. Тетраакрилат полиэтиленгликоля использовали для сшивания тиолированной ГК и тиолированного желатина в экструдированные гидрогели. Формирование гидрогеля происходило в течение 30 мин. Была показана



**Рис. 2.41.** Синтез дисульфид-сшитых гидрогелей путем тиол-дисульфидной реакции обмена между гиалуронатом, модифицированным пиридилдисульфидом, и дитиоломполиэтиленгликолем, с выделением хромогенной молекулы пиридин-2-тиона

на способность полученного геля поддерживать рост клеток и их пролиферацию (Jin et al., 2010). Тиолированная ГК и винилсульфон полиэтиленгликоля были сшиты с помощью реакции присоединения по Михаэлю. Время гелеобразования варьировалось от 1 до 14 мин, в зависимости от молекулярной массы полимеров, степени модификации гиалуронана и общей концентрации полимеров. Полученные гидрогели показали хорошую биосовместимость для инкапсулированных хондроцитов, что указывает на высокий потенциал применения гидрогелей для тканевой инженерии хрящей (Lei et al., 2011), а сшитый инъеклируемый гиалуронановый гидрогель на основе ГК, модифицированной винилсульфоном, и тиолата декстрана предложен для контролируемой доставки бевацизумаба, который после инъекционного введения гидрогеля находился в организме в течение 6 мес (Yu et al., 2015). Акрилат гиалуронана сшивали с использованием неразлагаемых и разлагаемых плазмином или тиолированных матричных металлопротеиназ в качестве сшивающих агентов с образованием гидрогелей при помощи реакции присоединения по Михаэлю. Полученные гели разлагались под действием гиалуронидазы либо сочетания гиалуронидазы и плазмينا или гиалуронидазы и матричных металлопротеиназ (Lei et al., 2011). Добавление гиалуронана к термочувствительным блок-сополимерам этиленоксида и пропиленоксида усиливает структуру геля, его мукоадгезивные свойства, не затрудняя процесс самоорганизации поллоксамеров, путем уменьшения температуры гелеобразования на несколько градусов Цельсия (Mayol et al., 2008). Гель на основе гиалуронана и поли-N-изопропилакриламида (ПНИПАМ) показал более продолжительное высвобождение рибофлавина (*in vitro*, до 12 ч) и изотиоцианата флуоресцеин-меченого бычьего сывороточного альбумина (до 60 ч при подкожной инъекцией *in vivo*) при увеличении степени прививания ПНИПАМ на полисахариде (Ha et al., 2006). Термообратимый инъекционный полимерный гидрогель ГК-g-(хитозан-g-ПНИПАМ) получали двойной прививкой гиалуронана и ПНИПАМ с карбоновой группой на конце к хитозану путем ковалентного связывания. Показана усиленная пролиферация мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в разработанных гидрогелях (Chen, Cheng, 2008). Серия гидрогелей на основе термочувствительных сополимеров, аминированных ГК, синтезирована за счет образования амидных связей (Tan et al., 2009). Ying и соавт. (Ren et al., 2015) разработали термо-

чувствительный гидрогель на основе конъюгата ГК–тирамин, содержащего пероксидазу хрена. Пероксидаза хрена была включена в смесь двух типов липосом: дипальмитоилфосфатидилхолина и димиристоилфосфатидилхолина.

Термочувствительные гидрогели (рис. 2.42), состоящие из ПНИ-ПАМ, хитозана и ГК, получены в работе Fang et al. (2008). Показано пролонгированное высвобождение гидрофильных и липофильных лекарственных препаратов, таких как нальбуфин и индометацин. Термообратимые гиалуронан-поли-N-изопропилакриламидные гидрогели (Mortisen et al., 2010) с определенной молекулярной структурой и свойствами синтезированы путем «клик»-реакций и полимеризации RAFT (рис. 2.43).

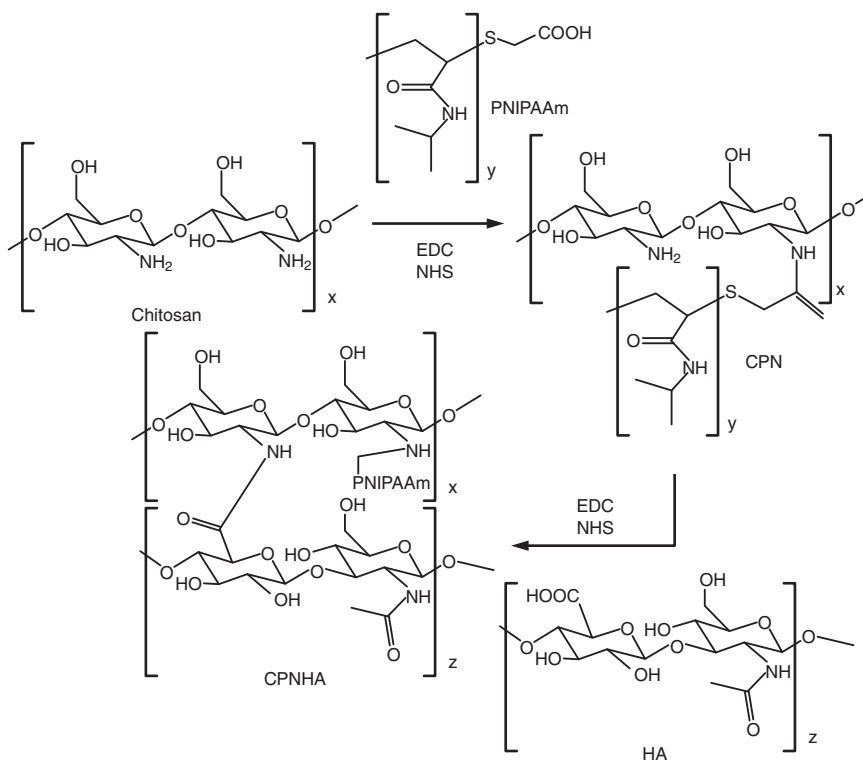
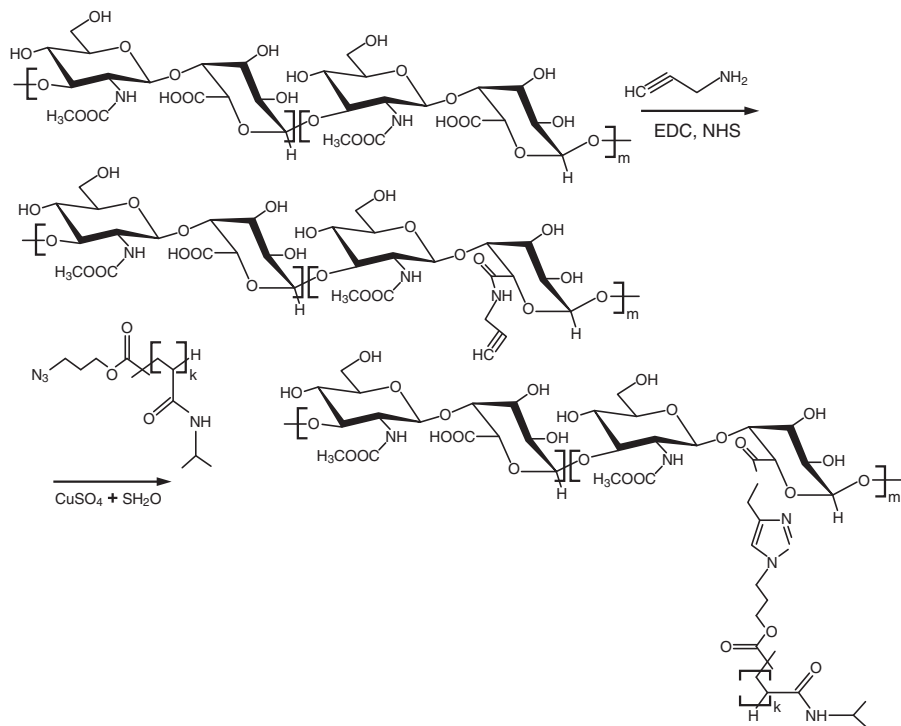


Рис. 2.42. Схема получения гидрогеля на основе хитозана, гиалуронана и поли-N-изопропилакриламида

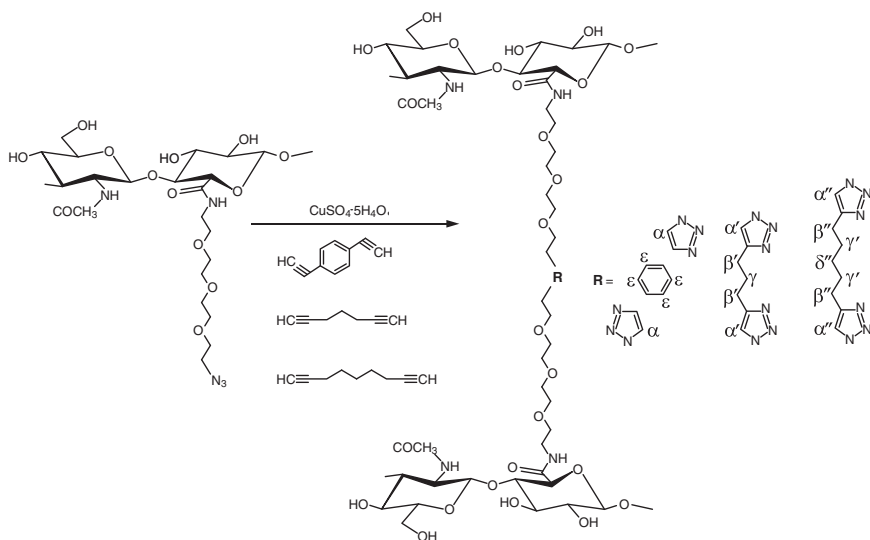


**Рис. 2.43.** Синтез сшитых гелей гиалуроновой кислоты, модифицированной пропаргиламидом

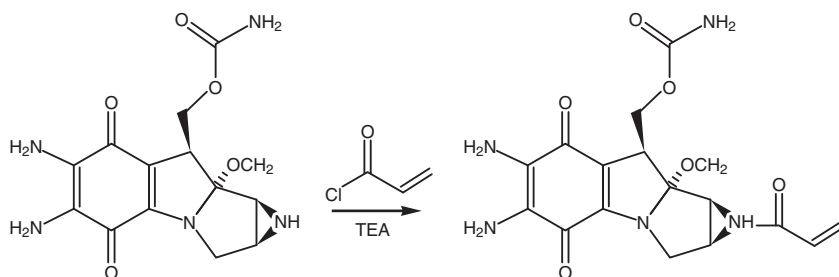
Модифицированную азидными группами ГК сшивали с помощью диалкиновых производных с образованием гидрогеля, используя реакцию 1,3-диполярного циклоприсоединения («клик»-реакция) в присутствии  $\text{Cu}$  (I) около 1 мин при комнатной температуре (рис. 2.44). В полученные гели вводили *in situ* доксорубин. Показано пролонгированное высвобождение лекарственного препарата до 150 ч, в зависимости от степени сшивания (Testa et al., 2009).

Синтезирован гидрогель, содержащий ковалентно связанное производное антипролиферативного препарата Митомидина  $\text{C}^*$  (ММС). Предварительно проводили активацию ММС (рис. 2.45), а затем его связывание с гиалуронатом. На рис. 2.46 приведена схема реакции связывания ММС-азиридирил-N-акрилата с тиол-модифицирован-





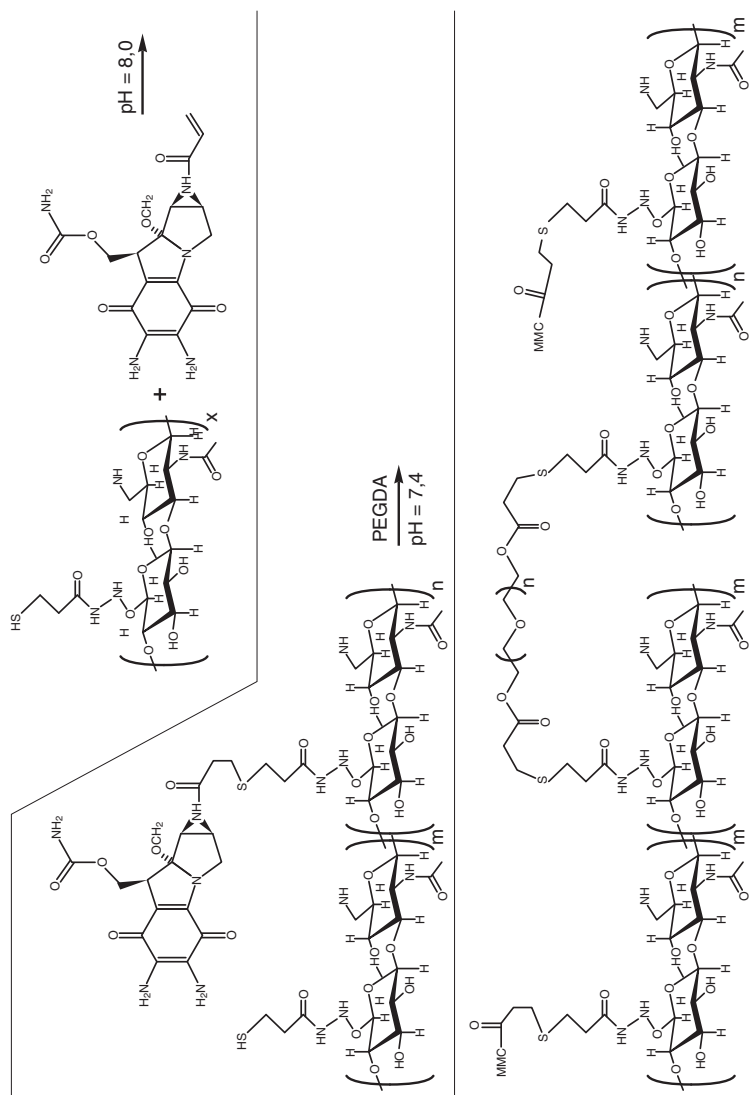
**Рис. 2.44.** Схема сшивания гиалуронана, модифицированного азидными группами



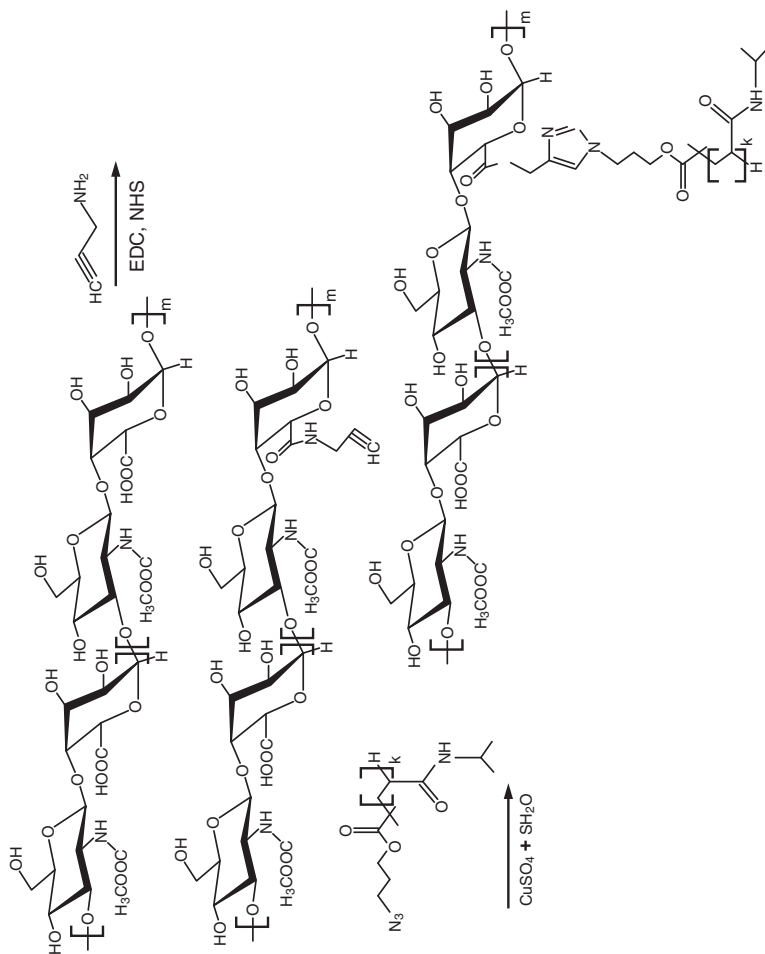
**Рис. 2.45.** Реакция модификации митомцина триэтиламином (TEA)

ной ГК, за которой следовала сшивка диакрилатом полиэтиленгликоля (Li et al., 2004).

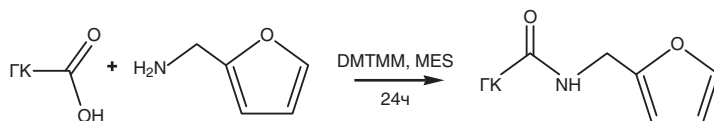
С помощью реакции Дильса–Альдера в водных растворах синтезированы гидрогели полисахарида (Nimmo et al., 2011). Фуран-модифицированные производные гиалуронана сшивали PEGDA (рис. 2.47, 2.48).



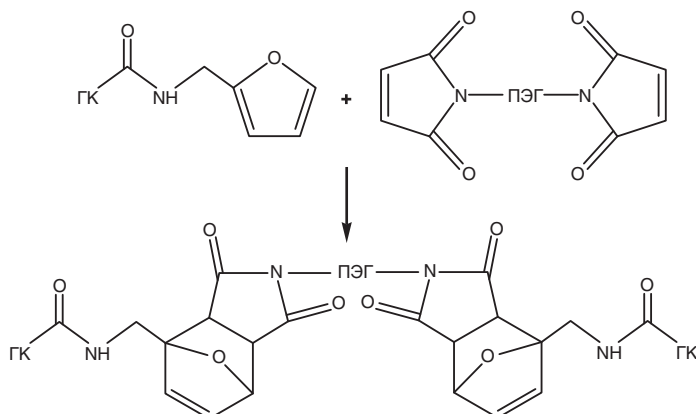
**Рис. 2.46.** Реакция получения гидрогелей на основе тиол-модифицированной гиалуроновой кислоты, митомидина, модифицированного акриламидом, и диакрилатот полиэтиленгликоля (PEGDA)



**Рис. 2.46.** Окончание. Реакция получения гидрогелей на основе тиол-модифицированной гиалуроновой кислоты, митомоцилина, модифицированного акриламидом, и диакрилатов полиэтиленгликоля (PEGDA)



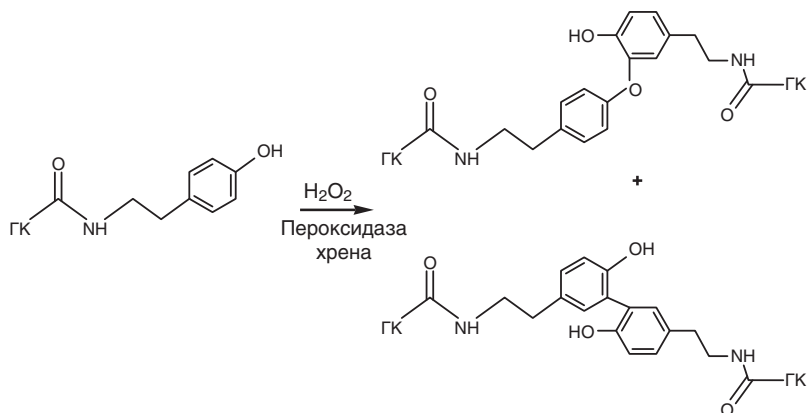
**Рис. 2.47.** Синтез фуран-модифицированной гиалуроновой кислоты при помощи 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолин хлорида (DMTMM) в 2-(N-морфолино)-этансульфонкислотном буфере (MES)



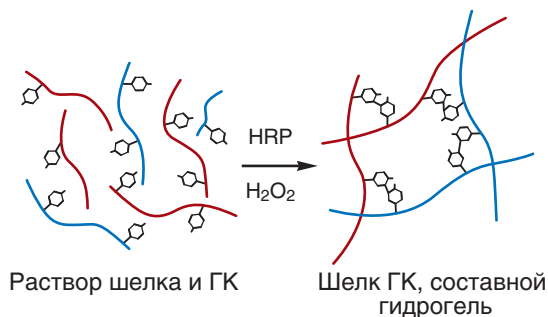
**Рис. 2.48.** Реакция Дильса–Альдера между фуран-модифицированной гиалуроновой кислотой и дималеимидполиэтиленгликолем. ПЭГ — полиэтиленгликоль

Синтезированы *in situ* сшитые гидрогели из тирамин-привитой ГК (Kurisawa et al., 2005) обработкой пероксидазой хрена и  $H_2O_2$  (рис. 2.49). Сначала получали конъюгат тирамин–гиалуронан с помощью КДИ и гидроксibenзотриазола. Образование гидрогеля происходило *in situ* при использовании двух шприцев, один из которых содержал тирамин–гиалуронан и  $H_2O_2$ , а другой — пероксидазу хрена для индуцирования реакции сшивания, протекающей по С–С и С–О связям между фенолами. Показано, что полученные гидрогели обладают биосовместимостью.

С участием фермента получены (Raia et al., 2017) гидрогели на основе шелкового фибрина и ГК (рис. 2.50). Механические свойства гидрогелей аналогичны свойствам нативных тканей. Формирование дитиразиновых мостиков между белками фибрина шелка при взаимодействии с пероксидазой хрена приводит к образованию высокоэластичных гелей, однако их жесткость зависит от времени, что связано



**Рис. 2.49.** *In situ* сшивание конъюгата гиалуронан–тирамин окислением перекисью водорода в присутствии пероксидазы хрена



**Рис. 2.50.** Сшивание гиалуронана и шелкового фибрина

с самоорганизацией и кристаллизацией шелка. Замена нативной ГК на конъюгат тирамин–ГК приводит к формированию гидрофильных, биологически активных гидрогелей, которые, однако, имеют ограниченные механические свойства и быстро разлагаются. При увеличении концентрации полисахарида уменьшается время гелеобразования, увеличивается скорость деградации и улучшаются механические свойства материала.

Гидрогели гиалуронана, синтезированные путем каталитического окислительного связывания тирамина и полисахарида в виде конъюгата в присутствии пероксидазы хрена и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , формируются в течение 1 мин, а их эластичные свойства (модуль упругости от 1 до 3 кПа) зависят от концентрации перекиси. В зависимости от степени сшивания

показано полное высвобождение лизоцима в течение 1–2 дней. *In vivo* быстрое гелеобразование достигается подбором оптимальной концентрации пероксидазы хрена, которая предотвращает диффузию флуоресцентных белков в месте инъекции (Lee et al., 2009). Гели на основе конъюгата гиалуронана и привитого декстран-тирамина быстро формируются в присутствии пероксидазы хрена и  $H_2O_2$ . Время гелеобразования (от 2 до 10 мин), модуль упругости геля (0,37–18 кПа) и скорость его деградации (от 4 до 21 дня) зависят от степени модификации и концентрации полимера. Полученные гелевые системы показали биосовместимость по отношению к инкапсулированным хондроцитам и их усиленную пролиферацию (Jin et al., 2010).

Инъекционный костный цемент на основе нанокристаллического апатита и гиалуронан-тирамина также формируется в течение 1 мин через окислительное связывание тираминовых фрагментов, катализируемых пероксидазой хрена и  $H_2O_2$ . Механическая прочность ( $G'_{\max} = 46,5$  кПа при содержании апатита 0,5 г/мл) зависит от количества апатита и концентрации  $H_2O_2$ . Разработанный цемент вводили мышам в дефекты суставов, при этом их полное восстановление наблюдалось в течение 8 нед (Pek et al., 2010). В статье Дроздовой и соавт. (2016) сообщается, что на основе хитозана, сшитого дженипином, и гиалуронана получены макропористые гидрогели с размером пор 100–500 мкм двумя методами: по первому методу на поверхности гидрогеля формировался полиэлектролитный комплекс хитозан–ГК, по второму методу ГК была распределена по всему объему геля. Данные биodeградируемые матрицы перспективны для применения в тканевой инженерии. Термочувствительный гидрогель для лечения остеоартрита получен на основе полисахарида и хитозана, сшитых дженипином (Patchornik et al., 2012). Полиэлектролитный гиалуронан + хитозан-гель, сшитый с использованием карбодиимидной реакции и высушенный лиофильной сушкой, представлен в работе Shanti et al. (2015).

Полоксамер, содержащий аминокислоты, был привит к гиалуроновой кислоте с формированием самоорганизующейся сетки, которая медленно высвобождает низкомолекулярные биологически активные соединения, такие как ципрофлоксацин (Cho et al., 2003) и гормон роста (Kim et al., 2002). Прививка гиалуронана к полоксамерам уменьшает критическую концентрацию гелеобразования и скорость распада сетки *in vivo*. Гидрогель полисахарида, содержащий гидразоновые связи, обеспечивает пролонгированное высвобождение локальных анестетиков (Ying et al., 2007) и контролирует высвобождение активатора плазминогена ткани (Ito et al., 2007) и будесонида (Ito et al., 2007) в брюшину.

Смесь тиолата гепарина и тиолата ГК образует гидрогель в присутствии диакрилата полиэтиленгликоля, который пролонгирует высвобождение фактора роста фибробластов *in vivo* (Cai et al., 2005). Тиолированный пептид был сшит метакрилатом с гиалуронатом, при этом время гелеобразования составляло 30 мин (Hahn et al., 2006).

Усиление структуры гиалуронатсодержащих гелей может быть реализовано не только в результате химического связывания, но и за счет ионных взаимодействий между макромолекулами ГК и солями металлов переменной валентности (рис. 2.51).

Узким местом в разработке инъекционных гиалуроновых гидрогелей является то, что достаточно жидкий для инъекции гель должен быть достаточно плотным по месту своей работы в организме (то есть *in situ*). Сочетать в геле такие реологические свойства одновременно невозможно, поэтому была сформулирована и реализована на практике концепция двухкомпонентного прегеля, становящегося полноценным гелем уже *in vivo*. Этот подход получил название «объятие гостя с хозяином». На наш взгляд, такой русский перевод оригинального термина *guest-host interaction* более удачно характеризует процесс гелеобразования, ибо в нем физическое (нековалентное) объединение двух типов полимерных молекул происходит временно и обратимо. За последнее десятилетие были созданы разные типы гелей, у которых имелись различные недостатки, препятствующие их дальнейшему продвижению в доклинических испытаниях: слишком быстрое затвердевание уже в процессе инъекционного введения или необходимость добавки отдельного отвердителя. В 2016 г. был предложен оригинальный способ решения этих проблем с использованием только модифицированной ГК (Rodell et al., 2016) (рис. 2.52).

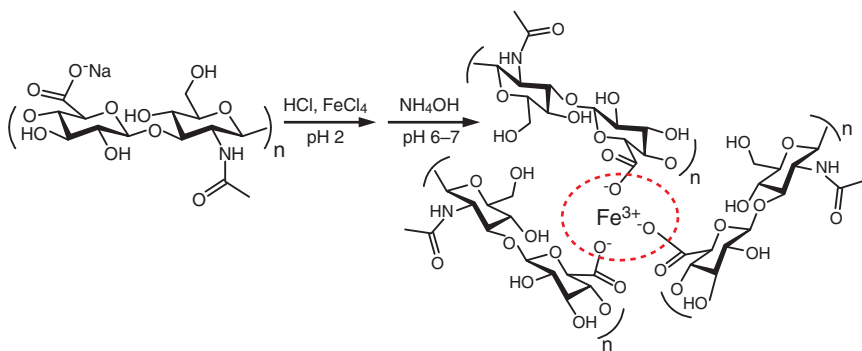
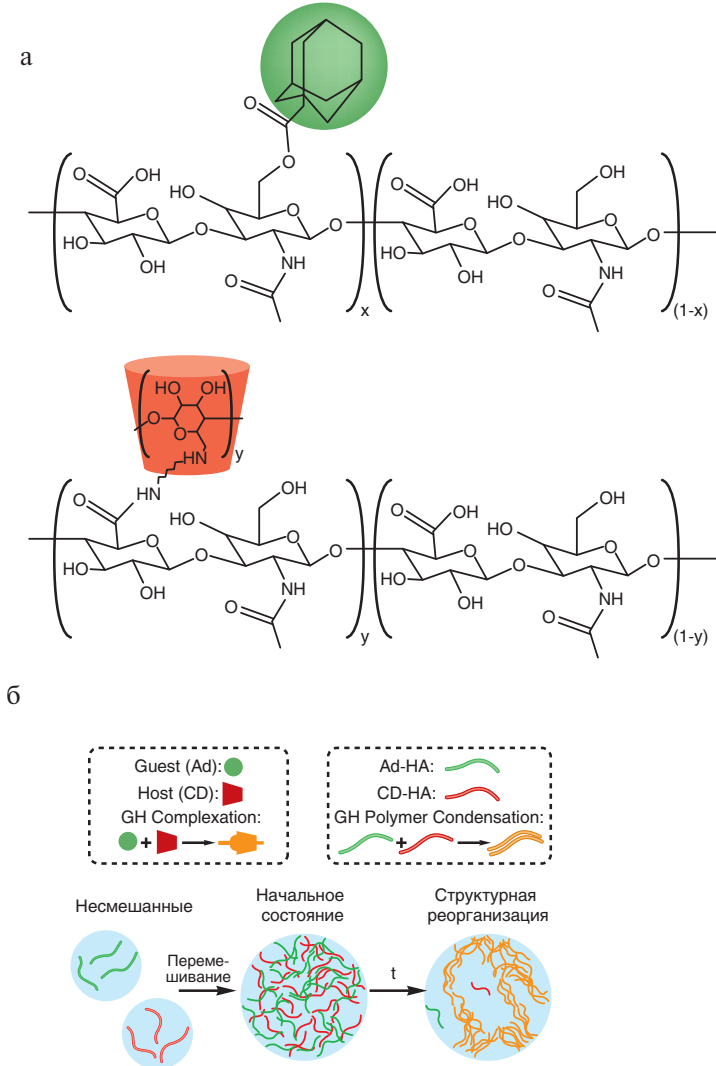


Рис. 2.51. Кросслинкинг гиалуронана за счет ионных связей с трехвалентным железом (Khunmanee et al., 2017)



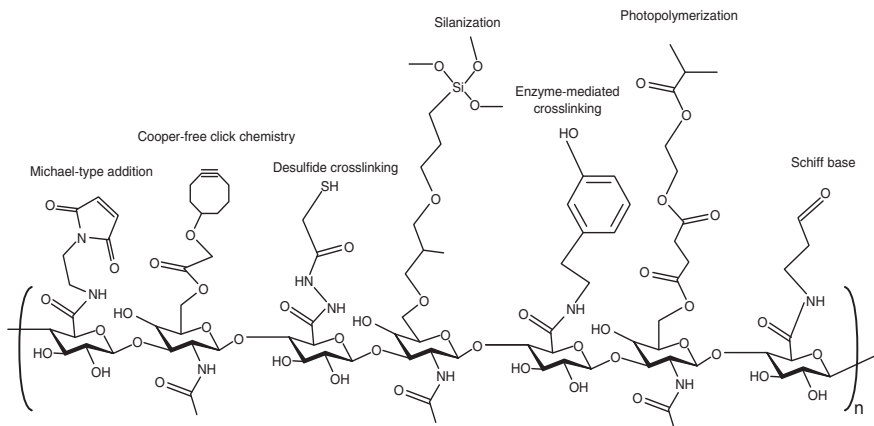
**Рис. 2.52.** Схема формирования геля *in vivo*, содержащего два типа химически модифицированных молекул гиалуронана (Rodell et al., 2016): а (левая половина рисунка) — молекулы гиалуронана с присоединенными адамантан-группами (adamantane Ad-HA), выделены зеленым; б (правая половина рисунка) — молекулы гиалуронана с присоединенным циклодекстрином ( $\beta$ -cyclodextrin CD-HA), выделены красным



Принципиальным свойством такого нового типа геля является его разжижение в шприце под действием механического сдвига (так называемый *Shear-thinning*) и формирование плотного геля в первую минуту после введения (Wei et al., 2016; Chen et al., 2017). Однако сам процесс подготовки прегеля занимает 3–4 нед (Rodell et al., 2016; Loebel et al., 2017). Апробация таких гелей пока происходит *in vitro* и показывает, что разные типы клеток, включая МСК, могут поддерживаться в таком геле в здоровом состоянии до 60 дней.

Физическое сшивание полимеров является одним из способов получения низкотоксичных гидрогелей. В основе физических сшивок лежат водородные связи, гидрофобные взаимодействия и ван-дер-ваальсовы силы. Сшивки за счет ионных взаимодействий в литературе также относят к физически сшитым гелям. Прочность ионных связей зависит от влияния внешних факторов, таких как pH среды, ионная сила, температура (Lapcik et al., 1998; Burdick et al., 2005). Физическое связывание значительно слабее по сравнению с образованием прочных ковалентных химических связей. Известно, что гидрогели могут быть сформированы путем ионного сшивания за счет образования полиэлектролитного комплекса. Во время формирования комплекса полиэлектролит может образовывать компактный гидрогель; если взаимодействия очень сильные, образуется нерастворимый полиэлектролитный комплекс и выпадает осадок. Выпадения осадка можно избежать путем ослабления электростатических взаимодействий. При этом фазовое разделение не происходит, и при понижении температуры формируется гель (Li, 2012; Краюхина и др., 2008). Факторами, влияющими на свойства полиэлектролитного комплекса, являются pH раствора, температура, ионная сила, порядок смешивания компонентов, гибкость полимера, молекулярная масса. **Наконец, примером нового метода получения композитного геля является синтез, в котором гиалуронан и желатин связаны через контакт с наночастицами золота (Skardal et al., 2010).** Авторы назвали этот метод динамическим кросслинкингом.

Подводя итог этому разделу, сформулируем общий вывод: химический кросслиндинг (поперечное 3D-сшивание и химическая конъюгация) формируется через ковалентное связывание линкеров (структурообразующих элементов) с модифицированными реакционными группами в составе ГК: тиолами, акрилатами, альдегидами, гидрозидами и аминами. Конкретная химическая структура линкера влияет на способность модифицированной молекулы полисахарида образовывать химические связи с другими молекулами (клеточными рецепторами, белками или структурами гельсодержащего каркаса) (рис. 2.53).



**Рис. 2.53.** Основные линкеры, определяющие последующие методы присоединения биоактивных молекул к остову макромолекулы гиалуроновой кислоты

Кроме того, до недавнего времени процесс формирования швиков был хаотичным. Современные технологии — электроспиннинг (electrospinning) и электроспрейинг (electrospraying) позволяют создавать гиалуроновый гидрогель с контролируемо ориентированными волокнами полисахарида (Vega et al., 2017). Таковым, в частности, является гидрогель Neprasil™, в котором тиол-модифицированные ГК и гепарин нанесены на остов, состоящий из фибрилл поли-ε-капролактона и коллагена (PCL/Col). Такие ориентированные структуры способствуют более эффективному действию внедренных в гидрогель лекарственных препаратов или факторов роста.

## 2.2. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ СТИМУЛИРОВАНИЯ ХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ГИАЛУРОНАНА

Наряду с большим количеством процессов химической трансформации гиалуроновых гидрогелей, приведенных в предыдущем разделе, нельзя обойти вниманием методы физического стимулирования химических превращений полисахаридов, такие как воздействие ионизирующего и УФ-излучения, механохимии (в частности, совместное воздействие высоких давлений и сдвиговых деформаций на сухие реакционные смеси). Как правило, подобные методы имеют ряд преимуществ, главное из которых — получение низкотоксичных конечных продуктов за счет

отсутствия технологических бифункциональных сшивающих агентов, так как необходимость удалять непрореагировавшие реагенты из сшитых гелей медицинского назначения — непростая задача. Кроме того, подобные технологии очень часто реализуются в одностадийном режиме, что значительно упрощает технологический регламент производства.

### 2.2.1. Фотосенсибилизированные реакции сшивания

Возможность протекания фотохимических реакций в органических соединениях напрямую зависит от спектральных характеристик облучаемого вещества. Основной постулат фотохимических превращений гласит, что они могут происходить только под действием света, который поглотился веществом. В этом аспекте рассмотрим строение ГК в связи с ее спектром светопоглощения и возможностью первичных фотохимических процессов с ее участием. В структуре линейной макромолекулы чередуются остатки глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина, и формально в строении полисахаридной молекулы имеются структурные элементы предельных углеводов, насыщенных спиртов, карбоксильные группы, замещенные ацетамидами. Таким образом, в молекуле ГК отсутствуют хромофорные группы с максимумом светопоглощения больше 240 нм. Наиболее длинноволновый максимум светопоглощения 214 нм имеет амидная группа, входящая в остаток N-ацетилглюкозамина (Свердлова, 1985). В работах Liu et al. (2006), Allen et al. (1985) приведены УФ-спектры поглощения мономерных звеньев гиалуронана. В спектрах N-ацетилглюкозамина (Liu et al., 2006) нет максимумов поглощения при длинах волн больше 205 нм, коэффициенты экстинкции при длинах волн больше 225 нм практически равны нулю. В спектре глюкуроновой кислоты, по данным Allen et al. (1985), имеется плечо в поглощении при 212 нм, при длинах волн больше 240 нм поглощение практически отсутствует. Вклад мономерных единиц в спектр поглощения происходит простым аддитивным способом, таким образом, что при каждой длине волны величина светопоглощения суммируется из светопоглощения мономеров. Приведенные в работах Rehakova et al. (1994), Kim et al. (2008), Choi et al. (2010) спектры поглощения гиалуронана в целом соответствуют простой теоретической модели. В зависимости от способа получения полисахарида в основном веществе могут присутствовать трудноудаляемые примеси белков и/или фрагментов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). В УФ-спектре поглощения водного раствора гиалуронана, полученного из петушиных гребней (Rehakova et al., 1994), имеется сильный максимум при 258 нм,

который не исчезал даже после интенсивной очистки препарата. В спектре поглощения полисахарида, полученного микробиологическим методом из *Streptococcus zooepidemicus*, максимума при 258 нм не наблюдается (Rehakova et al., 1994; Kim et al., 2008). Следует заметить, что в ГК, подвергнутой ферментативному расщеплению в растворе (Alkgrad et al., 2003), накапливаются продукты дегидратации концевой остатка глюкуроновой кислоты, содержащие двойную связь. Это приводит к появлению максимума поглощения в УФ-спектре при 226 нм для растворов гиалуронана со средней молекулярной массой 31 кДа. Исследованные в той же работе образцы с молекулярной массой 235 и 1200 кДа не имеют такого максимума светопоглощения. Хромофорная группа с соответствующим максимумом поглощения представляет собой структурный элемент с двойной связью углерод–углерод, сопряженной с карбоксильной группой в остатке глюкуроновой кислоты. По данным Xia et al. (2011), глюкуроновая кислота в определенных условиях может претерпевать перегруппировку, приводящую к образованию кетогруппы, сопряженной с двойной связью углерод–кислород в альдегидной группе и, как результат, к появлению максимума поглощения при 270 нм с молярным коэффициентом поглощения около 10. Предложенный в работе Xia et al. (2011) механизм может иметь место для концевых групп глюкуроновой кислоты. Авторы работы (Buffa et al., 2015) показали, что  $\alpha$ -,  $\beta$ -ненасыщенный альдегид гиалуронана, полученный окислением оксиметильной группы без разрушения пиранозного кольца N-ацетилглюкозамина, имеет максимум поглощения при 252 нм, и, по данным справочника (DMS UV Atlas of Organic Compounds, 1968), коэффициент молярного поглощения замещенного  $\alpha$ -,  $\beta$ -ненасыщенного альдегида в максимуме с длиной волны 240 нм составляет 14 000. Поскольку молярные коэффициенты поглощения в максимуме для 200 нм у амидной и карбоксильной группы невелики [приблизительно 20 и 40, соответственно (DMS UV Atlas of Organic Compounds, 1968)], небольшое количество образовавшихся непредельных связей, сопряженных с альдегидной или карбоксильной группой, может вносить существенный вклад в поглощение реальных образцов (Drimalova et al., 2005) гиалуронана. Согласно Bezakova et al. (2008), заметное увеличение поглощения в УФ-области при 240 нм было отнесено к непредельным карбонильным соединениям, образующимся из ГК, подвергнутой окислительной деструкции при микроволновом облучении. При этом их количество недостаточно для проявления изменений в ЯМР и ИК-спектрах, в том числе для образцов, подвергнувшихся наибольшему воздействию.

Приведенные выше результаты УФ спектроскопического исследования говорят в пользу малой эффективности фотоиндуцированной трансформации нативной ГК. Именно поэтому широкое распространение получили технологии полимеризации гиалуронановых гидрогелей в присутствии фотоактивных добавок (так называемый фотокросслинкинг) с помощью радикалов, образующихся при воздействии на такие смешанные гидрогели УФ-облучения. Наиболее активными группами, быстро связываемыми с радикалами, являются акрилаты и метакрилаты. Простая реакция полисахарида с метакриловым ангидридом формирует метакрилат ГК. Метакрилат гиалуронана получали с помощью глицидилметакрилата или метакрилатного ангидрида. Реакция сшивания проводилась по механизму свободнорадикальной полимеризации под действием УФ-облучения при 365 нм (рис. 2.54) с помощью фотоинициатора 2-оксо-кетоглутаровой кислоты или 4-(2-гидроксиэтокси)фенил-(2-гидрокси-2-пропил)кетона (Matsuda et al., 1978).

Другой функциональной формой гиалуронана является ГК-ГМА в результате его модификации глицидилметакрилатом (ГМА). Обе эти формы активно используются для присоединения других соединений. Фотокросслинкинг ГК-ГМА с акрилатом ПЭГ или N-диметилакриламида приводит к образованию плотного гидрогеля, в котором многочисленными линкерами служит диакрилат полиэтиленгликоля (PEGDA). Примерами такого типа фотосшитого геля являются Extracel и HyStem (Хабаров и др., 2012).

С помощью фотополимеризации под воздействием фотосенсибилизирующих катализаторов и света происходит преобразование жидкого раствора биополимера в гель. Фотополимеризация — реакция, которая происходит только при экспозиции светом нужной длины волны. Таким образом, реагенты могут быть полностью смешаны до начала про-

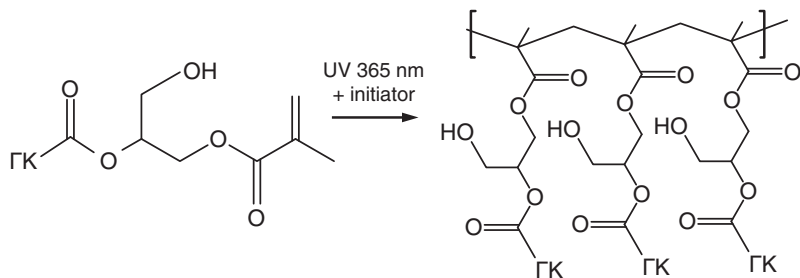


Рис. 2.54. Сшивание метакрилата гиалуронана фотооблучением

ведения реакции. Более того, реакции фотополимеризации можно проводить при физиологических условиях без неблагоприятных эффектов на участвующие в реакции биоактивные молекулы или инкапсулированные клетки (Рахматуллин и др., 2011; Mensitieri et al., 1996). Была проведена фотополимеризация гиалуронана с несколькими группами веществ, в том числе с циннамоилом, кумарином, тимином, метакриловым ангидридом, глицидилметакрилатом и стиролом. Кроме того, дальнейшая модификация сульфатированной ГК 4-азидоанилином позволяет получить производное полисахарида, формируемое в объекты размером всего 100 мкм (Хасанов и др., 2005).

Светоотверждающаяся ГК была синтезирована с помощью различных подходов (Matsuda et al., 1978). Гидроксильные или карбоксильные группы полимера этерифицировались фотоактивным соединением. Затем светоотверждающаяся ГК облучалась УФ-светом при использовании длин волн 260–400 нм. Фотоактивными хромофорами, которые реагируют с гидроксилами гиалуронана, являются коричные кислоты, 1-карбоксиялкиловые замещенные урацилы и 7-карбоксиялкосилзамещенные кумарины. С карбоксилами гиалуронана реагируют 1,2-О-этанотимин и производные 1,2-О-этанурацила.

Известны комбинации полиэтиленгликолевых олигогликольакрилатов и гиалуронана. Карбонилдиимидазол-активированный ПЭГ моноакрилатом применили для синтеза ПЭГ-акрилат-гиалуронана. Акрилированная ГК фотополимеризовалась под действием УФ-облучения при использовании в качестве инициатора 2,2-диметокси-2-фенилацетофенона (Desai et al., 1991). Сшитые гелевые матрицы на основе гиалуронана и полиглицеролполиглицедилового эфира были получены под действием видимого света (Yui et al., 1993). Реакция сшивания протекает в щелочной среде и температуре 60 °С, мгновенно после смешивания полисахарида с полиглицеролполиглицедиловым эфиром образуются непрозрачные гели с содержанием воды 99,5%.

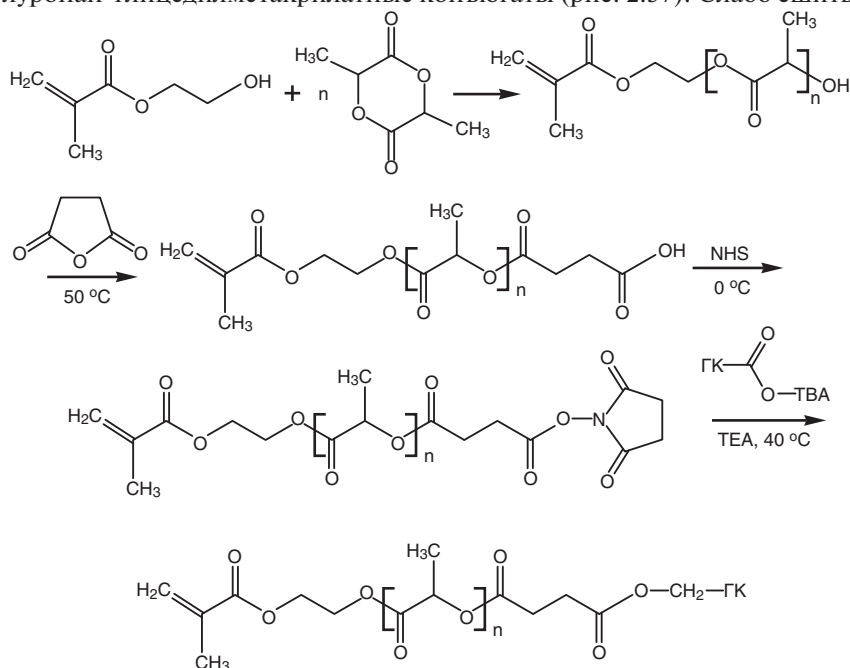
Фотосшитые гиалуронановые гидрогели получены *in situ*. Для чего использовались гидрогелевые прекурсоры: ГК, модифицированная глицидилметакрилатом (HA-GMA), частично окисленная периодатом натрия (ГКох), за которой следовала конъюгация GMA (Naoh-GMA), а также сшитая с синтетическим полимером перед введением GMA. Кроме того, использовали олигомерный поли(2-гидроксиэтил метакрилат) (P(HEMA)) с 31% поли(N,N-диметилакриламид) (P(DMAM)) (рис. 2.55).

ГК модифицировали метакриловым ангидридом, затем фотополимеризовали с образованием гидрогеля с различной степенью сшивки



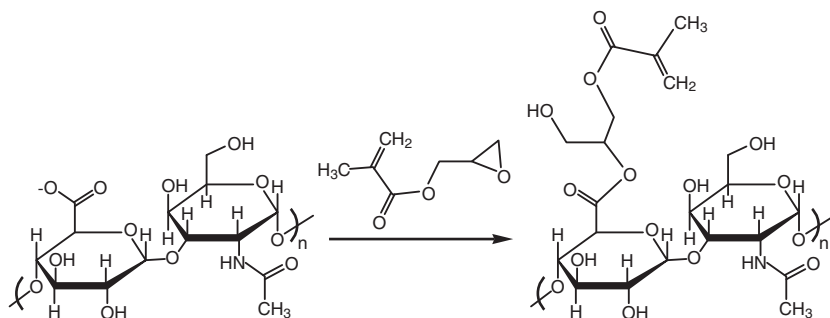
(Burdick et al., 2005). Этот процесс включает образование радикалов при воздействии света на инициирование и рост цепи по виниловым группам модифицированного гиалуронана.

Синтезирован макромер гиалуронан — молочная кислота — метакрилат (рис. 2.56), фотополимеризация которого дает новый класс гидрогелей (Sahoo et al., 2008). Для контроля микроструктуры и межцепочечных взаимодействий использовали три направления синтеза гидрогелей, модифицированных метакрилатными группами. Показано, что эти направления позволяют регулировать реологические свойства от вязкоэластичных, наблюдаемых в слабо сшитых гелях и концентрированных растворах микросфер, до эластичных в микрогелях, которые ведут себя как псевдопластичные жидкости, имеющие определенный, более высокий предел текучести. Сначала синтезировали гиалуронан-глицедилметакрилатные конъюгаты (рис. 2.57). Слабо сшитые



**Рис. 2.56.** Синтез макромера гиалуронан — молочная кислота — метакрилат (ТВА — тетрабутиламмоний, ТЕА — триэтиламин, NHS — N-гидроксисукцинимид)



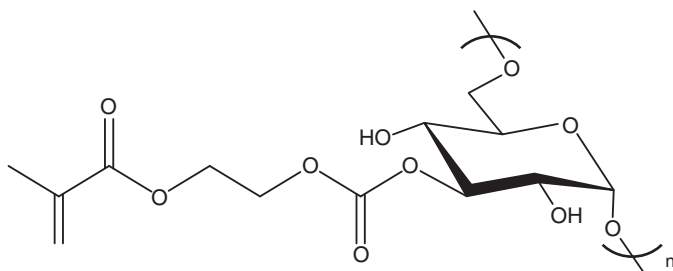


**Рис. 2.57.** Модификация гиалуроновой кислоты глицидилметакрилатом

гидрогели получали растворением конъюгатов в буфере, добавлением фотоинициатора при УФ-облучении. Микросферы получали приготовлением эмульсий на основе конъюгатов. При центрифугировании микросфер получали эластичный микрогель (Prata et al., 2010).

Приводятся результаты синтеза полупроницаемого гиалуронанового 3D-гидрогеля и гидроксиэтил-метакрилата-производного декстрана, сшитого фотополимеризацией (рис. 2.58) (Pescosolido et al., 2011).

Для пролонгированной доставки лекарств в офтальмологии предложены фотогели гиалуронана, совместимые с эпителиальными клетками пигмента сетчатки глаза. Предложена прививка антрацена, модифицированного ПЭГ, вдоль скелета макромолекулы ГК (рис. 2.59). Аминотерминированные ПЭГ-антраценовые молекулы синтезированы с помощью карбодиимидной реакции (Wells et al., 2011).



**Рис. 2.58.** Химическая структура декстрана, модифицированного гидроксиэтил-метакрилатом

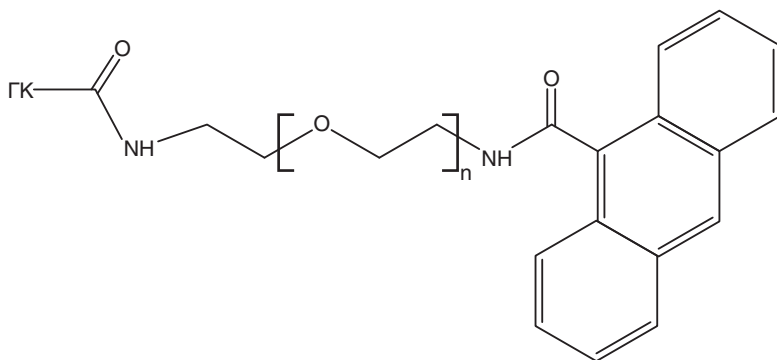


Рис. 2.59. ПЭГ-антрацен, привитый на гиалуроновой кислоте

Модифицированная ГК, содержащая метакрилатные группы, может быть переведена в эластичные гидрогели с помощью радикальной полимеризации в присутствии окислительно-восстановительных инициаторов или фотоиницированием (Burdick et al., 2005). Фотоиницированное радикальное сшивание позволяет осуществлять временной и пространственный контроль над геометрией и свойствами гидрогелей (Brigham et al., 2009). Свойства полученных гидрогелей изменяются в зависимости от молекулярной массы полисахарида, степени метакрилатирования и концентрации (Brigham et al., 2009). С использованием аналогичного метода получены механически прочные гидрогели на основе коллагена и гиалуронана (Seidlits et al., 2011). Фотосшиваемый фибронектин может быть ковалентно интегрирован в гели на основе ГК, модифицированной глицидилметакрилатом, для усиления клеточной адгезии (Patterson et al., 2010).

Кроме плотности сшивания, специфическая реакция, применяемая для метакрилатирования, определяет кинетику деградации радикально сшитых гидрогелей гиалуронана (Lei et al., 2011). Например, ГК, модифицированную глицидилметакрилатом, можно получить с использованием реакции переэтерификации при низком или при высоком значении pH. Поскольку сложноэфирные связи подвержены гидролизу, в то время как простые эфирные связи стабильны в водной среде, можно получить гидрогели с различной стабильностью в воде. Помимо радикальной фотополимеризации, метакриловая ГК может участвовать в реакции присоединения по Михаэлю.

Инъекционный гидрогель для хрящевой тканевой инженерии создан на основе метакрилатированного гликолевого хитозана и ГК, фотосши-

тых в присутствии фотоинициатора рибофлавина при УФ-облучении (Park et al., 2013). Минимальное время облучения, необходимое для проведения реакции, составляет 40 с, при этом жизнеспособность инкапсулированных хондроцитов составила 87–90%. Увеличение времени облучения от 40 до 600 с значительно изменяло модуль упругости гидрогелей до 17 кПа, при этом жизнеспособность инкапсулированных клеток снижалась до 60–65%. Введение гиалуронана в композитных гидрогелях увеличивало пролиферацию и адгезию хрящевой внеклеточной матрицы инкапсулированными хондроцитами.

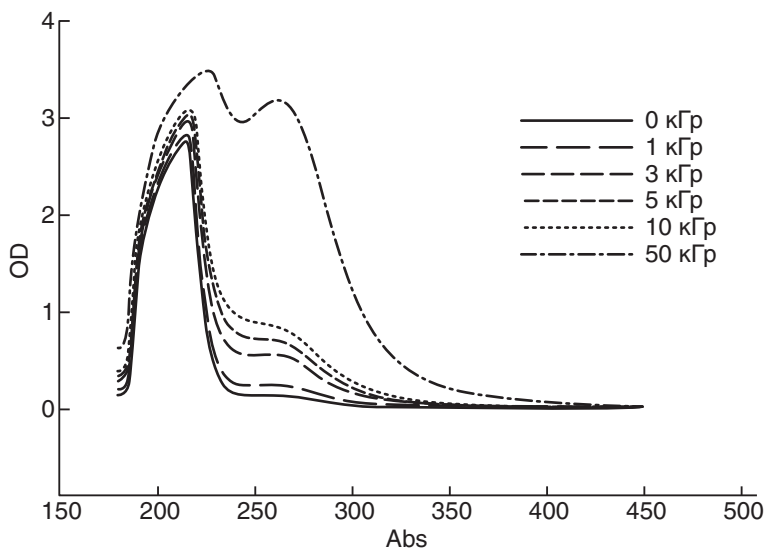
Для лечения глаукомы получены микросферы на основе сополимера D, L-молочной и гликолевой кислот с инкапсулированным 5-ФУ в гидрогеле ГК (Bora et al., 2016). Проведены два эксперимента: в первом использовался раствор гиалуронана, содержащий микросферы с 5-ФУ, во втором метакрилат гиалуронана и микросферы с 5-ФУ подвергались реакции сшивания под действием инициатора при УФ-облучении. Показано, что во втором случае происходит замедление высвобождения 5-ФУ — до 15 дней.

Описан синтез механочувствительных гидрогелей на основе гиалуронана с применением блок-сополимерных мицелл на основе гидрофильной полиакриловой кислоты, частично модифицированной 2-гидроксиэтилакрилатом, и гидрофобного поли-*n*-бутилакрилата, которые использовали, с одной стороны, в качестве лекарственных депо, с другой — в качестве сшивающих агентов (Xiao et al., 2013). Гидрогели получали радикальной полимеризацией глицидилметакрилата гиалуронана в присутствии хВСМ. Полученные гели имели модуль упругости  $847 \pm 43$  Па.

## 2.2.2. Радиационно-химическая модификация

Изменение физико-химических, структурных и антиоксидантных свойств радиационно-модифицированной ГК подробно освещено в работах Kim et al. (2008), Lal (1985), Zhaohui et al. (2011). Результаты показали, что, кроме уменьшения молекулярной массы и вязкости, изменяется также pH водного раствора ГК и ее цвет, который становится интенсивно желтым. УФ-спектры облученных растворов гиалуронана показали изменение в области 230–265 нм, что указывает на образование двойных связей (см. рис. 2.12). По-видимому, это аналогично действию бактериальных гиалуронатлиаз, которые осуществляют внутримолекулярный гидролиз, в результате которого образуются дисахаридные фрагменты с двойной связью между углеродными ато-

мами  $C_4$  и  $C_5$  глюкуроновой кислоты (Хабаров и др., 2012; Хабаров, Бойков, 2016). Появление двойной связи дает возможность спектрофотометрически определять количество и кинетику деполимеризации гиалуронана (рис. 2.60), детектируя оптическую плотность на длине волны в области поглощения 230–265 нм.



**Рис. 2.60.** УФ-спектры  $\gamma$ -облученной гиалуроновой кислоты. Верхняя кривая соответствует водному раствору гиалуронана, облученному дозой 50 кГр

Изучение ИК-спектров облученных образцов ГК свидетельствует об изменении в области поглощения 1800–1200  $\text{см}^{-1}$  (Zhaohui et al., 2011). Различие в положении максимумов полос поглощения валентных колебаний  $\text{C}=\text{O}$  групп (1725  $\text{см}^{-1}$  в необлученном образце и 1720  $\text{см}^{-1}$  в облученном) связывают с превращениями карбоксильной группы полисахарида. Максимум полосы поглощения двойной связи  $\text{C}=\text{C}$ , сопряженной в цикле с  $\text{C}=\text{O}$  ( $\sim 1600\text{см}^{-1}$ ), смещается при облучении в длинноволновую область на 2  $\text{см}^{-1}$ , при этом наблюдается снижение интенсивности поглощения. Различия в высоте и форме отдельных полос поглощения ИК-Фурье-спектров, наблюдаемые в диапазоне 1700–1750  $\text{см}^{-1}$ , связывают с превращениями карбоксильной группы. Эти структурные изменения свидетельствуют о возможном формировании кольца пиранкарбоксильной кислоты (Zhaohui et al., 2011).

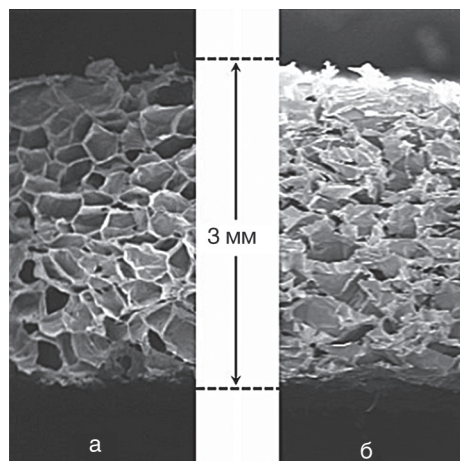
Весьма интересными оказались результаты по разработке методов радиационно-индуцированного синтеза наночастиц золота при  $\gamma$ -облучении гиалуроновых гидрогелевых композиций (Hien et al., 2012; Dang, Bui, 2013). Без дополнительного использования каких-либо восстановителей и поглотителей ОН-радикалов получали достаточно равномерное распределение наночастиц золота в гидрогелевых средах. В практическом плане, при разработке медицинских препаратов с наночастицами золота, ГК является почти идеальной матрицей для стабилизации подобных систем (Успенский, Хабаров, 2013).

В некоторых работах ГК рассматривалась как носитель (конъюгат) диагностических или терапевтических радионуклидов, например  $^{188}\text{Re}$  (Antocchia et al., 2007). Одним из перспективных направлений исследований в этой области радиобиологии является разработка препаратов на основе конъюгатов ГК и стабильного изотопа бора-10 для нейтронзахватной терапии онкологических заболеваний (Волков и др., 2012; Иванов и др., 2013; Koryakin et al., 2014; Khabarov et al., 2013; Uspeskii et al., 2014). Сравнительный анализ результатов накопления полихелатных соединений бора с гиалуронатом в опухоли мышей с меланомой В-16 после внутриопухолевого введения дает обнадеживающие результаты для лечения радиорезистентных новообразований.

Как было сказано выше, радиационное воздействие на водные растворы ГК не способно инициировать химическое сшивание макромолекул с образованием сетчатых структур, но в смеси с другими соединениями может приводить к образованию устойчивых трехмерных полимерных сеток — гелевых структур. В работе Zhang (2012)  $\gamma$ -излучение от источника кобальта  $^{60}\text{Co}$  было использовано для прививки глицидилметакрилата на ГК в целях формирования ГМАНА-конъюгата. В результате облучения был получен сшитый гидрогель, обладающий значительными водопоглощающими свойствами. Антиоксидантные возможности и устойчивость к ферментативному разложению сшитого геля были значительно выше, чем у самой ГК. Эти же авторы сделали успешные попытки привить метакрилатные группы на ГК по той же технологии. Было показано, что степень сшивки увеличивалась с увеличением дозы  $\gamma$ -излучения. Как доказали авторы, данный метод обеспечивает новый способ получения гидрогелей гиалуронана с контролируемым сшиванием.

Влияние  $\gamma$ -облучения на взаимодействие гиалуронана с 1,2-дипальмитоил-Sn-глицеро-3-фосфатидилхолином при реакции в эмульсионных пузырьках было исследовано в работе Ahmad et al. (2014). Радиационно-

ционно сшитые композиции ГК с подобными добавками проявляют повышенную стабильность к воздействию свободных радикалов (например, ОН). Такие материалы могут в дальнейшем служить радиопротекторами и антиоксидантами, а также в качестве вязкопротекторной матрицы при поражении суставного хряща (Al-Assaf et al., 1995). Комплексные гидрогели для тканевой инженерии кожных покровов на основе хондроитинсульфата, синтетического поливинилового спирта и ГК были получены с применением радиационной технологии в работе Zhao et al. (2014). Были синтезированы гидрогели с различными соотношениями компонентов и исследованы их физико-химические свойства. Полученные образцы гидрогелей показали 85–88% степень гелирования при поглощенной дозе облучения, составляющей 15 кГр. Все гидрогели имели содержание воды на уровне более 90% и достигли равновесного набухания в течение 24 ч. Кроме содержания воды и кинетики набухания, была также исследована кинетика ферментативного разложения гелей, а также динамика выхода *in vitro* лекарственного средства из подобных объектов, их цитотоксичность и рост кератиноцитов человека в композитном геле. На основе данных экспериментов была оценена целесообразность использования подобных гидрогелей в искусственных заменителях кожи. Сходные по задачам исследования по тканевой инженерии провели Acevedo et al. (2013), Хабаров и Сафоян (2009) для композитных гелей состава желатин–хитозан–гиалуронан и силикон–гиалуронан. Основной целью данных работ было исследование возможности радиационной стерилизации подобных продуктов. Для стерилизации авторы использовали три дозы  $\gamma$ -излучения: 1, 10 и 25 кГр. Микроструктурные изменения облученных полимеров были оценены с помощью сканирующей электронной микроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии (Acevedo et al., 2013) и измерения диффузионных параметров газопроницаемости (Хабаров, Сафоян, 2009). Доза излучения в 25 кГр приводила к огрублению микроструктуры геля (рис. 2.61), уменьшению пористости (с 99 до 96%), размера пор (от 160 до 123 нм) и изменению температуры стеклования от 31,2 до 42,10 °С (при дозе облучения от 1 до 25 кГр соответственно) (Acevedo et al., 2013). Радиационная обработка материала силикон–гиалуронан приводила к трехкратному снижению коэффициента диффузии для кислорода и водяного пара (Хабаров, Сафоян, 2009), что благоприятно сказывалось при использовании такого гелеобразного материала при лечении келоидных и гипертрофических рубцов.



**Рис. 2.61.** Различие в текстуре композиционного гидрогеля: а — до облучения; б — после облучения дозой 25 кГр

На полученных облученных образцах изучали поведение фибробластов кожи человека. Человеческие клетки кожи, выращенные на облученном 10 и 25 кГр исследуемом гелевом каркасе, распространялись в течение 48 ч и секретировались трансформирующим фактором роста (TGF  $\beta$ 3-V3). Дозы 0 кГр (необлученный) или 1 кГр не стимулировали TGF- $\beta$ 3-секрецию или пролиферацию клеток. Удельная скорость роста клеток увеличилась пропорционально дозе облучения. Авторы пришли к выводу, что  $\gamma$ -излучение изменяет пористую структуру образцов и улучшает рост клеток в дозах облучения до 10 кГр.

Еще один вариант подобных гелевых матриц на основе биосовместимых биоразлагаемых гидрогелей поливинилпирролидона (ПВП), желатина и ГК был рассмотрен в работе Lim et al. (2011). Данный тип гидрогелей, полученный при полимеризации под действием  $\gamma$ -излучения, был разработан для использования при пероральной доставке лекарственных средств. Авторы варьировали как соотношение компонентов, так и дозу  $\gamma$ -облучения. Смеси «гиалуронан–желатин» и «гиалуронан–ПВП» образуют гели с различной степенью сшивания в зависимости от состава мономера и дозы облучения. Увеличение степени сшивки при облучении было подтверждено методом термогравиметрического анализа и изучением кинетики набухания. Эти гидрогели при набухании имели самое высокое содержание воды при соотношении компонентов

«гиалуронан–желатин» 1:10 и 1:5 для композиции «гиалуронан–ПВП» (доза облучения составляла 30 кГр).

Все эти данные показывают, что радиационная модификация гиалуронановых гидрогелей является весьма перспективным методом, использование которого поможет открыть новые перспективы в дальнейшем развитии тканевой инженерии биоматериалов.

Несколько слов скажем о механохимических превращениях гиалуронана в контексте обсуждаемой темы этого раздела. Начиная с 70-х гг. прошлого века проводятся систематические исследования совместного воздействия высокого давления и сдвиговых деформаций на твердые вещества органической природы. Твердофазный метод модификации твердых реакционных смесей имеет ряд особенностей, и главная из них — это распределение компонентов на молекулярном или кластерном уровне, а для полимерных соединений — на сегментальном уровне. Одно из основных преимуществ твердофазного метода состоит в смешении и проведении реакций несовместимых в жидких средах реагентов. Идентификация активных состояний при различных условиях механического воздействия позволяет установить возможности протекания химических процессов и прогнозировать пути их эффективного использования. Деформирование твердых тел, независимо от их химической природы, сопровождается глубокой разупорядоченностью твердого вещества с образованием наноразмерных структур и большого количества активных центров [электронно- и колебательно-возбужденные связи, электроны и ионы, стабилизированные в ловушках, низкокоординированные атомы в ядре дислокаций и других структурных дефектах, метастабильные атомные и молекулярные структуры (Барамбойм, 1978)]. Именно поэтому твердотельные механопротекания имеют большое сходство с фотохимическими и радиационно-химическими процессами.

При ориентирующем действии деформирования на макромолекулы полисахарида сшивание ГК протекает на поверхности и внутри отдельной твердотельной частицы. Процесс протекает с высокой скоростью и, что особенно важно, в отсутствие жидкой среды. При твердофазном процессе не происходит образование монолитного геля, как в жидкофазном процессе, а размер гелевых частиц задается средним размером исходного порошка; это микронный уровень распределения по размерам. Высокая скорость сшивания показана на примере реакции гиалуронана с диэпоксидами, где время деформирования на наковальне Бриджмена не превышало 30 с, а при сшивании ГК в экструдере — 4 мин. Полученную таким образом шитую ГК исследова-



ли ИК-Фурье- и ЯМР-спектроскопическими методами и подвергали рентгеноструктурному анализу (Хабаров, Зеленецкий, 2008; Хабаров и др., 2008, 2012).

Реакции с участием химически активных групп гиалуронана с различными биосоединениями протекают при твердофазном деформировании посредством физического и ковалентного связывания полисахарида с введенными биодобавками. Поскольку совмещение исходных веществ и их распределение по объему протекает в момент деформирования, то введение в структуру биоактивных добавок происходит в момент сшивания полимера. Как показано в работе по иммобилизации трипсина на полисахаридах (Зеленецкий и др., 2003), активность добавок при этом практически не снижается, а продолжительность выделения из препарата увеличивается. Достаточно обратиться к списку патентов за последний период для различных биоактивных композиций гиалуронана, полученных методом твердофазного смешения под давлением (Волков и др., 2008–2012), чтобы убедиться в эффективности этого способа создания препаратов широкого медицинского назначения.

## ЛИТЕРАТУРА

- Барамбойм Н.К. Механохимия высокомолекулярных соединений. 3-е изд. М.: Химия, 1978.
- Вильданова Р.Р., Сигаева Н.Н., Куковинец О.С., Власова Н.М., Колесов С.В. Модифицированные гиалуроновая кислота и хитозан для получения гидрогелей // Вестн. Башкирск. ун-та. 2016. Т. 21, № 1. С. 63–68.
- Волков В.П., Зеленецкий А.Н., Иванов П.Л., Хабаров В.Н. Способ получения борсодержащей гиалуроновой кислоты. Пат. РФ № 2445978. 2012.
- Волков В.П., Зеленецкий А.Н., Хабаров В.Н., Селянин М.А. Способ получения модифицированной аскорбиновой кислотой сшитой соли гиалуроновой кислоты и биоактивная композиция на ее основе. Пат. РФ № 2382050 на изобретение (приоритет от 05.06.2008). 2010. Бюл. № 5.
- Волков В.П., Зеленецкий А.Н., Хабаров В.Н., Селянин М.А. Способ получения модифицированной токоферолом сшитой соли гиалуроновой кислоты и биоактивная композиция на ее основе. Пат. РФ № 2382052 на изобретение (приоритет от 09.07.2008). 2010. Бюл. № 5.
- Волков В.П., Зеленецкий А.Н., Хабаров В.Н., Селянин М.А. Способ получения модифицированной фолиевой кислотой сшитой соли гиалуроновой кислоты. Пат. РФ № 2387670 на изобретение (приоритет от 30.07.2008). 2010. Бюл. № 12.
- Волков В.П., Зеленецкий А.Н., Хабаров В.Н., Селянин М.А. Способ получения модифицированной витаминами сшитой соли гиалуроновой кислоты. Пат. РФ № 2387671 на изобретение (приоритет от 30.07.2008). 2010. Бюл. № 12.

- Волков В.П., Зеленецкий А.Н., Хабаров В.Н., Селянин М.А. Способ получения модифицированной ретинолом сшитой соли гиалуроновой кислоты. Пат. РФ № 2386641 на изобретение (приоритет от 09.07.2008). 2010. Бюл. № 11.
- Волков В.П., Зеленецкий А.Н., Хабаров В.Н., Селянин М.А. Способ получения модифицированной рибофлавином сшитой соли гиалуроновой кислоты. Пат. РФ № 2008125328 на изобретение (приоритет от 25.06.2008). 2010. Бюл. № 11.
- Дроздова М.Г., Водякова Т.С., Демина Т.С., Маслова М.В. и др. Макропористые биodeградируемые матриксы на основе хитозана и гиалуроновой кислоты для тканевой инженерии // Изв. УНЦ РАН. 2016. Т. 3, № 1. С. 33–35.
- Зеленецкий А.Н., Акопова Т.А., Кильдеева Н.Р., Вихорева Г.А. и др. Иммуобилизация трипсина на полисахаридах при интенсивном механическом воздействии // Изв. АН. Сер. хим. 2003. № 9. С. 1963–1967.
- Иванов П.Л., Корякин С.Н., Хабаров В.Н., Ядговская В.А. и др. Синтез и использование для нейтрон-захватной терапии полихелатов гиалуронана и бора-10 // Хим.-фарм. журн. 2013. Т. 42, № 5. С. 111–115.
- Краюхина М.А., Самойлова Н.А., Ямсков И.А. Полиэлектrolитные комплексы хитозана: формирование, свойства и применение // Успехи химии. 2008. Т. 77, № 9. С. 854–869.
- Понеделькина И.Ю., Лукина Е.С., Одинокоев В.Н. Кислые гликозаминогликаны и их химическая модификация // Биоорган. химия. 2008. Т. 34, № 1. С. 5–28.
- Понеделькина И.Ю., Одинокоев В.Н. Природные гликозаминогликаны и их химическая модификация // Вестн. АН РБ. 2009. Т. 14, № 1. С. 26–31.
- Рахматуллин Р.Р., Бурлуцкая О.И., Адельшина Л.Р., Бурцева Т.И. Разработка инновационного наноструктурированного биоматериала для офтальмомикрохирургии // Врач. 2011. № 5. С. 22–24.
- Свердлова О.В. Электронные спектры в органической химии. Л.: Химия, 1985.
- Успенский С.А., Хабаров В.Н. Твердофазный способ получения водорастворимого биоактивного нанокompозита на основе модифицированной меланином соли гиалуроновой кислоты и наночастиц золота. Пат. РФ № 2532032. 2013.
- Успенский С.А., Хабаров В.Н. Твердофазный способ получения водорастворимого биоактивного нанокompозита на основе модифицированной лимонной кислотой соли гиалуроновой кислоты и наночастиц золота. Пат. РФ № 2534789. 2013.
- Хабаров В.Н., Бойков П.Я. Биохимия гиалуроновой кислоты. М.: Тисо-принт, 2016.
- Хабаров В.Н., Бойков П.Я., Селянин М.А. Гиалуроновая кислота. М.: Практическая медицина, 2012.
- Хабаров В.Н., Зеленецкий А.Н. Нанотехнологическая ретикуляция гиалуроновой кислоты // Kosmetik Intern. 2008. № 2. С. 8–15.
- Хабаров В.Н., Сафоян А.А. Многокомпонентный силиконовый гель для лечения и профилактики гипертрофических и келоидных рубцов // Вестн. эстет. медицины. 2009. Т. 8, № 3. С. 74–81
- Хабаров В.Н., Селянин М.А., Зеленецкий А.Н. Твердотельная модификация гиалуроновой кислоты для целей эстетической медицины // Вестн. эстет. медицины. 2008. Т. 7, № 3. С. 18–24.

- Хасанов А.Г., Суфияров И.Ф., Сибатуллин Н.Г. Разработка и применение имплантатов на основе гликозаминогликанов и комплексов метиленового синего в хирургии. Уфа: БГМУ, 2005.
- Acevedo A., Somoza A., Weinstein-Opppenheimer C., Silva S. et al. Improvement of human skin cell growth by radiation-induced modifications of a Ge/Ch/Ha scaffold // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2013. Vol. 36. P. 317–324.
- Ahmad A., Mohd H, Mawardi M. Effect of gamma irradiation on hyaluronic acid and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) interaction // *AIP Conference Proceedings*. 2014. Vol. 1614, N 1. P. 69–73.
- Al-Assaf, S., Phillips G.O., Deeble D.J., Parsons B. et al. The enhanced stability of the cross-linked hylan structure to hydroxyl (OH) radicals compared with the uncross-linked hyaluronan // *Radiat. Phys Chem.* 1995. Vol. 46, N 2. P. 207–217.
- Alkrad J.A., Mrestani Y., Stroehl D., Wartewig S. et al. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV/Vis spectroscopies // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003. Vol. 31. P. 545–550.
- Allen K., Khan R., Watson D. Use of a diode-array detector in investigation of neonatal organic aciduria // *Clin. Chem.* 1985. Vol. 31, N 4. P. 561–563.
- Antoccia A., Baldazzi G., Banzato A., Bello M. et al. A YAP camera for the biodistribution of <sup>188</sup>Re conjugated with Hyaluronic-Acid in «in vivo» systems // *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 2007. Vol. 571, N 1–2. P. 484–487.
- Balazs E.A., Hargittai I., Hargittai M. *History of Hyaluronan Science*. N.J.: G&H Soho, 2012.
- Banerji S., Wright A.J., Noble M., Mahoney D.J. et al. Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. Vol. 14. P. 234–239.
- Bencherif S., Srinivasan A., Horkay F., Hollinger J. et al. Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties // *Biomaterials*. 2008. Vol. 29, N 12. P. 1739–1749.
- Bergman K., Elvingson C., Hilborn J., Svensk G. et al. Hyaluronic acid derivatives prepared in aqueous media by triazine-activated amidation // *Biomacromolecules*. 2007. Vol. 8, N 7. P. 2190–2195.
- Bezakova Z., Hermannova M., Drimalova E., Malovikova A. et al. Effect of microwave irradiation on the molecular and structural properties of hyaluronan // *Carbohydr. Polym.* 2008. Vol. 73. P. 640–646.
- Bora M., Mundargi R.C., Chee Y.D., Wong T.T.L. et al. 5-Fluorouracil microencapsulation and impregnation in hyaluronic acid hydrogel as composite drug delivery system for ocular fibrosis // *Cogent Med.* 2016. Vol. 3. Article ID 1182108.
- Brigham M.D., Bick A., Lo E., Bendali A. et al. Mechanically robust and bioadhesive collagen and photo cross-linkable hyaluronic acid semi-interpenetrating networks // *Tissue Eng. Pt A.* 2009. Vol. 15. P. 1645–1653.
- Buffa R., Sedova P., Basarabova I., Moravcova M. et al.  $\alpha$ ,  $\beta$ -Unsaturated aldehyde of hyaluronan — synthesis, analysis and application // *Carbohydr. Polym.* 2015. Vol. 134. P. 293–299.
- Bulpitt P., Aeschlimann D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels // *J. Biomed. Mater. Res.* 1999. Vol. 47, N 2. P. 152–169.

- Burdick J.A., Chung C., Jia X.Q., Randolph M.A., Langer R. Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks // *Biomacromolecules*. 2005. Vol. 6. P. 386–391.
- Cai S.S., Liu Y.C., Shu X.Z., Prestwich G.D. Injectable glycosaminoglycan hydrogels for controlled release of human basic fibroblast growth factor // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26, N 30. P. 6054–6067.
- Calles J.A., Ressia J.A., Llabot J.M., Vallés E.M. et al. Hyaluronan-itaconic acid-glutaraldehyde films for biomedical applications: preliminary studies // *Sci. Pharm.* 2016. Vol. 84, N 1. P. 61–72.
- Chen F.M., Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering // *Prog. Polym. Sci.* 2016. Vol. 53. P. 86–168.
- Chen J.P., Cheng T.H. Bone regeneration using 3D hyaluronic acid and chitosan-containing thermo-reversible hydrogel and canine mesenchymal stem cells // *J. Biotechnol.* 2008. Vol. 136. P. S128–S129.
- Chen M.H., Wang L.L., Chung J.J., Kim Y.H. et al. Methods To Assess Shear-Thinning Hydrogels for Application As Injectable Biomaterials // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2017. Vol. 3, N 12. P. 3146–3160.
- Cho K.Y., Chung T.W., Kim B.C., Kim M.K. et al. Release of ciprofloxacin from poloxamer-graft-hyaluronic acid hydrogels in vitro // *Int. J. Pharm.* 2003. Vol. 260, N 1. P. 83–91.
- Choh S., Cross D., Wang C. Facile synthesis and characterization of disulfide-cross-linked hyaluronic acid hydrogels for protein delivery and cell encapsulation // *Biomacromolecules*. 2011. Vol. 12. P. 1126–1136.
- Choi J., Kim J.K., Kim J.H., Kweon D.K. et al. Degradation of hyaluronic acid powder by electron beam irradiation, gamma ray irradiation, microwave irradiation and thermal treatment: a comparative study // *Carbohydr. Polym.* 2010. Vol. 79. P. 1080–1085.
- Chytil M., Pekař M. Effect of new hydrophobic modification of hyaluronan on its solution properties: evaluation of self-aggregation // *Carbohydr. Polym.* 2009. Vol. 76, N 3. P. 443–448.
- Collins M.N., Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering // *Carbohydr. Polym.* 2013. Vol. 92, N 2. P. 1262–1279.
- Collins M., Birkinshaw C. Comparison of the effectiveness of four different cross-linking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications // *J. Appl. Polym. Sci.* 2007. Vol. 104, N 5. P. 3183–3191.
- Crescenzi V., Francescangeli A., Capitani D., Mannina L. et al. Hyaluronan networking via Ugi's condensation using lysine as cross-linker diamine // *Carbohydr. Polym.* 2003. Vol. 53, N 3. P. 311–316.
- Crescenzi V., Francescangeli A., Segre A.L., Capitani D. et al. New cross-linked and sulfated derivatives of partially deacetylated hyaluronan: synthesis and preliminary characterization // *Biopolymers*. 2002. Vol. 64. P. 86–94.
- Dang V.P., Bui D.D. Study on gamma radiation-induced synthesis of gold nanoparticles stabilized by hyaluronan // *Tap Chi Hoa Hoc*. 2013. Vol. 51, N 4. P. 510–513.
- Danishefsky I., Siskovic E. Conversion of carboxyl groups of mucopolysaccharides into amides of amino acid esters // *Carbohydr. Res.* 1971. Vol. 16, N 1. P. 199–205.
- Della Valle F., Romeo A. Esters of hyaluronic acid. US Patent No. 4851521. 2008.

- Desai N.P., Hill-West J.L., Hubbell J.A., Pathak C.P. et al. US Patent No. 5567435. 1991.
- DMS UV Atlas of Organic Compounds. Vol. IV. London: Butterworths, 1968. Spectrum B6/1, B6/2.
- Drimalova E., Velebny V., Sasinkova V., Hromadkova Z. et al. Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating // *Carbohydr. Polym.* 2005. Vol. 61. P. 420–426.
- Eenschooten C., Guillaumie F., Kontogeorgis G., Stenby E. et al. Preparation and structural characterisation of novel and versatile amphiphilicoctenyl succinic anhydride-modified hyaluronic acid derivatives // *Carbohydr. Polym.* 2010. Vol. 79, N 3. P. 597–605.
- Eun J., Kang S., Kim B., Jiang G. et al. Control of the molecular degradation of hyaluronic acid hydrogels for tissue augmentation // *J. Biomed. Mat. Res. Pt A.* 2008. Vol. 86, N 3. P. 685–693.
- Fang J.-Y., Chen J.-P., Leu Y.-L., Hu J.-W. Temperature-sensitive hydrogels composed of chitosan and hyaluronic acid as injectable carriers for drug delivery // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008. Vol. 68. P. 626–636.
- Feng Q., Lin S., Zhang K., Dong C. et al. Sulfated hyaluronic acid hydrogels with retarded degradation and enhanced growth factor retention promote hMSC chondrogenesis and articular cartilage integrity with reduced hypertrophy // *Acta Biomater.* 2017. Vol. 53. P. 329–342.
- Freudenberg U., Liang Y., Kiick K.L., Werner C. Glycosaminoglycan-based biohybrid hydrogels: a sweet and smart choice for multifunctional biomaterials // *Adv. Mater.* 2016. Vol. 28, N 40. P. 8861–8891.
- Glass J., Dickerson K., Stecker K., Polarek J. Characterization of a hyaluronic acid-Arg-Gly-Asp peptide cell attachment matrix // *Biomaterials.* 1996. Vol. 17, N 11. P. 1101–1108.
- Ha D.I., Lee S.B., Chong M.S., Lee Y.M. et al. Preparation of thermo-responsive and injectable hydrogels based on hyaluronic acid and poly(N-isopropylacrylamide) and their drug release behaviors // *Macromol. Res.* 2006. Vol. 14, N 1. P. 87–93.
- Hahn S.K., Oh E.J., Miyamoto H., Shimobouji T. Sustained release formulation of erythropoietin using hyaluronic acid hydrogels cross-linked by Michael addition // *Int. J. Pharm.* 2006. Vol. 322, N 1–2. P. 44–51.
- Hahn S.K., Park J.K., Tomimatsu T., Shimoboji T. Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hydrogels // *Intern. J. Biol. Macromol.* 2007. Vol. 40. P. 374–380.
- Hiemstra C., van der Aa L.J., Zhong Z., Dijkstra P.J. et al. Novel in situ forming, degradable dextran hydrogels by Michael addition chemistry: synthesis, rheology, and degradation // *Macromolecules.* 2007. Vol. 40. P. 1165–1173.
- Hien N.Q., Phu D.V., Duy N.N., Quoc L.A. Radiation synthesis and characterization of hyaluronan capped gold nanoparticles // *Carbohydr. Polym.* 2012. Vol. 89, N 2. P. 537–541.
- Hirano K., Sakai S., Ishikawa T., Avci F., Linhardt R., Toida T. Preparation of the methyl ester of hyaluronan and its enzymatic degradation // *Carbohydr. Res.* 2005. Vol. 340, N 14. P. 2297–2304.

- Huin-Amargier C., Marchal P., Payan E., Netter P. et al. New physically and chemically cross-linked hyaluronate (HA)-based hydrogels for cartilage repair // *J. Biomed. Mat. Res. Pt A*. 2006. Vol. 76, N 2. P. 416–424.
- Hyung W., Ko H., Park J., Lim E. et al. Novel hyaluronic acid (HA) coated drug carriers (HCDCs) for human breast cancer treatment // *Biotech. Bioeng.* 2008. Vol. 99. P. 442–454.
- Ito T., Fraser I.P., Yeo Y., Highley C.B. et al. Anti-inflammatory function of an in situ cross-linkable conjugate hydrogel of hyaluronic acid and dexamethasone // *Biomaterials*. 2007. Vol. 28, N 10. P. 1778–1786.
- Jeanloz R., Forchielli E. Studies on hyaluronic acid and related substances. I. Preparation of hyaluronic acid and derivatives from human umbilical cord // *J. Biol. Chem.* 1950. Vol. 186, N 2. P. 495–511.
- Jha A.K., Hule R.A., Jiao T., Teller S.S. et al. Structural analysis and mechanical characterization of hyaluronic acid-based doubly cross-linked networks // *Macromolecules*. 2009. Vol. 42, N 2. P. 537–546.
- Jia X., Colombo G., Padera R., Langer R. et al. Prolongation of sciatic nerve blockade by in situ cross-linked hyaluronic acid // *Biomaterials*. 2004. Vol. 25, N 19. P. 4797–4804.
- Jia X., Yeo Y., Clifton R.J., Jiao T. et al. Hyaluronic acid-based microgels and microgel networks for vocal fold regeneration // *Biomacromolecules*. 2006. Vol. 7, N 12. P. 3336–3344.
- Jin R., Moreira Teixeira L.S., Krouwels A., Dijkstra P.J. et al. Synthesis and characterization of hyaluronic acid-poly(ethylene glycol) hydrogels via Michael addition: an injectable biomaterial for cartilage repair // *Acta Biomater.* 2010. Vol. 6, N 6. P. 1968–1977.
- Jin R., Teixeira L.S., Dijkstra P.J., van Blitterswijk C.A. et al. Enzymatically-cross-linked injectable hydrogels based on biomimetic dextran-hyaluronic acid conjugates for cartilage tissue engineering // *Biomaterials*. 2010. Vol. 31, N 11. P. 3103–3113.
- Khbarov V.N., Selyanin M.A., Polak F. New supramolecular system for boron neutron capture therapy based on hyaluronic acid // 9th Intern. Conference on Hualuronan. Oklahoma, 2013 June 2–7.
- Khunmanee S., Jeong Y., Park H. Cross-linking methods of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications // *J. Tissue Eng.* 2017. Vol. 8. URL: <https://doi.org/10.1177/2041731417726464>.
- Kim H., Kim K., Park I., Choi B.S. et al. Hybrid scaffolds composed of hyaluronic acid and collagen for cartilage regeneration // *Tissue Eng. Regen. Med.* 2012. Vol. 9, N 2. P. 57–62.
- Kim J., Kim K.S., Jiang G., Kang H. et al. In vivo real-time bio-imaging of hyaluronic acid derivatives using quantum dots // *Biopolymers*. 2008. Vol. 89. P. 1144–1153.
- Kim J.K., Srinivasan P., Kim, J.H., Choi J.-I. et al. Structural and antioxidant properties of gamma irradiated hyaluronic acid // *Food Chem.* 2008. Vol. 109, N 4. P. 763–770.
- Kim M.R., Park T.G. Temperature-responsive and degradable hyaluronic acid/pluronic composite hydrogels for controlled release of human growth hormone // *J. Control. Release*. 2002. Vol. 80, N 1–3. P. 69–77.

- Koryakin S.N., Yadrovskaya V.A., Beketov E.E., Isaeva E.V. et al. The study of HA compounds for neutron capture and photon activation therapies // *Centr. Eur. J. Biol.* 2014. Vol. 9, N 10. P. 922–930.
- Kuo J., Swann D., Prestwich G. Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides // *Bioconjugate Chem.* 1991. Vol. 2, N 4. P. 232–241.
- Kurisawa M., Chung J., Yang Y., Gao S.J. et al. Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid-tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering // *Chem. Commun.* 2005. Vol. 14, N 34. P. 4312–4314.
- Lal M. Radiation induced depolymerization of HA in aqueous solution at pH 7,4 // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 1985. Vol. 92, N 1. P. 105–112.
- Lapcik L. Jr, Lapcik L., De Smedt S., Demeester J. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications // *Chem. Rev.* 1998. Vol. 98, N 8. P. 2663–2684.
- Larrañeta E., Henry M., Irwin N.J., Trotter J. et al. Synthesis and characterization of hyaluronic acid hydrogels cross-linked using a solvent-free process for potential biomedical applications // *Carbohydr. Polym.* 2018. Vol. 181. P. 1194–1205.
- Laurent T., Hellsing K., Gelotte B. Cross-linked gels of hyaluronic acid // *Acta Chem. Scand.* 1964. Vol. 18, N 1. P. 274–275.
- Lee F., Chung J.E., Kurisawa M. An injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogelsystem for protein delivery // *J. Control. Rel.* 2009. Vol. 134. P. 186–193.
- Lee H., Hong B.-J., Lee J.H., Yeo S. et al. Hyaluronate-death receptor 5 antibody conjugates for targeted treatment of liver metastasis // *Biomacromolecules.* 2016. Vol. 17, N 9. P. 3085–3093.
- Lee Y., Lee H., Kim Y.B., Kim J. et al. Bioinspired surface immobilization of hyaluronic acid on monodispersemagnetite nanocrystals for targeted cancer imaging // *Adv. Mater.* 2008. Vol. 20. P. 4154–4157.
- Lei Y., Gojgini S., Lam J., Segura T. The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32, N 1. P. 39–47.
- Li H., Liu Y., Shu X.Z., Gray S.D. et al. Synthesis and biological evaluation of a cross-linked hyaluronan-mitomycin C hydrogel // *Biomacromolecules.* 2004. Vol. 5. P. 895–902.
- Li Y., Rodrigues J., Tomas H. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Vol. 41, N 6. P. 2193–2221.
- Lim Y.M., Gwon H.J., Park J.S., Nho Y.C. et al. Synthesis and properties of hyaluronic acid containing copolymers cross-linked by  $\gamma$ -ray irradiation // *Macromol. Res.* 2011. Vol. 19, N 5. P. 436–441.
- Liu D., Wei Y., Yao P., Jiang L. Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards // *Carbohydr. Res.* 2006. Vol. 341. P. 782–785.
- Loebel C., Rodell C.B., Chen M.H., Burdick J.A. Shear-thinning and self-healing hydrogels as injectable therapeutics and for 3D-printing // *Nat. Protoc.* 2017. Vol. 12, N 8. P. 1521–1541.
- Loebel C., Szczesny S., Cosgrove B., Alini M. et al. Cross-linking chemistry of tyramine-modified hyaluronan hydrogels alters mesenchymal stem cell early attachment and behavior // *Biomacromolecules.* 2017. Vol. 18. P. 855–864.



- Luo Y., Kirker K.R., Prestwich G.D. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery // *J. Control Release*. 2000. Vol. 69, N 1. P. 169–184.
- Luo Y., Ziebell M.R., Prestwich G.D. A hyaluronic acid-Taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells // *Biomacromolecules*. 2000. Vol. 1. P. 208–218.
- Magnani A., Rappuoli R., Lamponi S., Barbucci R. Novel polysaccharide hydrogels: characterization and properties // *Polym. Adv. Technol*. 2000. Vol. 11, N 8–12. P. 488–495.
- Malson T., Lindqvist B. WO/1986/000079. Matsuda T., Moghaddam M.J., Sakurai K. US Patent No. 5462976. 1978.
- Mayol L., Quaglia F., Borzacchiello A., Ambrosio L. et al. A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: rheological, mucoadhesive and in vitro release properties // *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2008. Vol. 70, N 1. P. 199–206.
- Mensitieri M., Ambrosio L., Nicolais L. Viscoelastic properties modulation of a novel auto cross-linked hyaluronic acid polymer // *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 1996. Vol. 7. P. 695–698.
- Mlbochov P., Hjkov V., Steiner B. Preparation and characterization of biodegradable alkylether derivatives of hyaluronan // *Carbohydr. Polym*. 2007. Vol. 69. P. 344–352.
- Mlčochová P., Bystrický S., Steiner B., Machová E. et al. Synthesis and characterization of new biodegradable hyaluronan alkyl derivatives // *Biopolymers*. 2006. Vol. 82, N 1. P. 74–79.
- Mortisen D., Peroglio M., Alini M., Eglin D. Tailoring thermoreversible hyaluronan hydrogels by «click» chemistry and RAFT polymerization for cell and drug therapy // *Biomacromolecules*. 2010. Vol. 11. P. 1261–1272.
- Nakajima N., Ikada Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media // *Bioconjug. Chem*. 1995. Vol. 6, N 1. P. 123–130.
- Nimmo C.M., Owen S.C., Shoichet M.S. Diels-Alder click cross-linked hyaluronic acid hydrogels for tissue engineering // *Biomacromolecules*. 2011. Vol. 12. P. 824–830.
- Nishi C., Nakajima N., Ikada Y. In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification // *J. Biomed. Mater. Res*. 1995. Vol. 29, N 7. P. 829–834.
- Oh E.J., Kang S.W., Kim B.S., Jiang G. et al. Control of the molecular degradation of hyaluronic acid hydrogels for tissue augmentation // *J. Biomed. Mater. Res*. 2008. Vol. 86A. P. 685–693.
- Oh E.J., Kim J.W., Kong J.H., Ryu S.H. et al. Signal transduction of hyaluronic acid-peptide conjugate for FPRL1 receptor // *Bioconjug. Chem*. 2008. Vol. 19. P. 2401–2408.
- Oh E.J., Park K., Kim K.S., Kim J. et al. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives // *J. Control. Release*. 2010. Vol. 141, N 1. P. 2–12.
- Ossipov D.A., Piskounova S., Hilborn J. Poly(vinyl alcohol) cross-linkers for in vivo injectable hydrogels // *Macromolecules*. 2008. Vol. 41, N 11. P. 3971–3982.
- Park H., Choi B., Hu J., Lee M. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering // *Acta Biomater*. 2013. Vol. 9, N 1. P. 4779–4786.
- Patchornik S., Ram E., Shalom N.B., Nevo Z. et al. Chitosan-hyaluronate hybrid gel intraarticular injection delays osteoarthritis progression and reduces pain in a rat



- meniscectomy model as compared to saline and hyaluronate treatment // *Adv. Orthop.* 2012. Vol. 2012. Article ID 979152.
- Patterson J., Siew R., Herring S.W., Lin A.S.P. et al. Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration // *Biomaterials.* 2010. Vol. 31. P. 6772–6781.
- Pek Y.S., Kurisawa M., Gao S., Chung J.E. et al. The development of a nanocrystalline apatite reinforced cross-linked hyaluronic acid-tyramine composite as an injectable bone cement // *Biomaterials.* 2010. Vol. 31, N 11. P. 3103–3113.
- Pescosolido L., Schuurman W., Malda J., Matricardi P. et al. Hyaluronic acid and dextran-based semi-IPN hydrogels as biomaterials for bioprinting // *Biomacromolecules.* 2011. Vol. 12, N 5. P. 1831–1838.
- Piron E., Tholin R. WO/2002/006350.
- Prata J.E., Barth T.A., Bencherif S.A., Washburn N.R. Complex fluids based on methacrylated hyaluronic acid // *Biomacromolecules.* 2010. Vol. 11. P. 769–775.
- Pravata L., Braud C., Boustta M., El Ghzaoui A. et al. New amphiphilic lactic acid oligomer-hyaluronan conjugates: Synthesis and physicochemical characterization // *Biomacromolecules.* 2008. Vol. 9, N 1. P. 340–348.
- Pouyani T., Prestwich G.D. Functionalized derivatives of hyaluronic acid oligosaccharides: drug carriers and novel biomaterials // *Bioconj. Chem.* 1994. Vol. 5, N 4. P. 339–347.
- Raia N.R., Partlow B.P., McGill M., Kimmerling E.P. et al. Enzymatically cross-linked silk-hyaluronic acid hydrogels // *Biomaterials.* 2017. Vol. 131. P. 58–67.
- Rehakova M., Bakos D., Soldan M., Vizarova K. Depolymerization reactions of hyaluronic-acid in solution // *Int. J. Biol. Macromol.* 1994. Vol. 16. P. 121–124.
- Ren C.D., Kurisawa M., Chung J.E., Ying J.Y. Liposomal delivery of horseradish peroxidase for thermally triggered injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogel scaffolds // *J. Mater. Chem. B.* 2015. Vol. 3. P. 4663–4670.
- Rodell C.B., Highley C.B., Chen M.H., Dusaj N.N. et al. Evolution of hierarchical porous structures in supramolecular guest-host hydrogels // *Soft Matter.* 2016. Vol. 12, N 37. P. 7839–7847.
- Sahoo S., Chung C., Khetan S., Burdick J.A. Hydrolytically degradable hyaluronic acid hydrogels with controlled temporal structures // *Biomacromolecules.* 2008. Vol. 9. P. 1088–1092.
- Sannino A., Madaghiale M., Conversano F., Mele G. et al. Cellulose derivative-hyaluronic acid-based microporous hydrogels cross-linked through divinyl sulfone (DVS) to modulate equilibrium sorption capacity and network stability // *Biomacromolecules.* 2004. Vol. 5, N 1. P. 92–96.
- Schante C.E., Zuber G., Herlin C., Vandamme T.F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications // *Carbohydr. Polym.* 2011. Vol. 85, N 3. P. 469–489.
- Seidlits S.K., Drinnan C.T., Petersen R.R., Shear J.B. et al. Fibronectin-hyaluronic acid composite hydrogels for three-dimensional endothelial cell culture // *Acta Biomater.* 2011. Vol. 7. P. 2401–2409.
- Serban M., Yang G., Prestwich G. Synthesis, characterization and chondroprotective properties of a hyaluronan thioethyl ether derivative // *Biomaterials.* 2008. Vol. 29, N 10. P. 1388–1399.

- Serban M.A., Prestwich G.D. Synthesis of hyaluronan haloacetates and biology of novel cross-linker-free synthetic extracellular matrix hydrogels // *Biomacromolecules*. 2007. Vol. 8. P. 2821–2828.
- Shanti Krishna A., Radhakumary C., Sreenivasan K. Calcium ion modulates protein release from chitosan-hyaluronic acid poly electrolyte gel // *Polym. Eng. Sci.* 2015. Vol. 55, N 9. P. 2089–2097.
- Shu X.Z., Liu Y., Luo Y., Roberts M.C. et al. Disulfide cross-linked hyaluronan hydrogels // *Biomacromolecules*. 2002. Vol. 3, N 6. P. 1304–1311.
- Skardal A., Zhang J., McCoard L., Oottamasathien S. et al. Dynamically cross-linked gold nanoparticle-hyaluronan hydrogels // *Adv. Mater.* 2010. Vol. 22. P. 4736–4740.
- Skardal A., Zhang J., Prestwich G.D. Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels cross-linked with tetrahedral polyethylene glycol tetracrylates // *Biomaterials*. 2010. Vol. 31, N 24. P. 6173–6181.
- Tan H., Chu C.R., Payne K.A., Marra K.G. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering // *Biomaterials*. 2009. Vol. 30, N 1. P. 2499–2506.
- Tan H., Ramirez C.M., Miljkovic N., Li H. et al. Thermosensitive injectable hyaluronic acid hydrogel for adipose tissue engineering // *Biomaterials*. 2009. Vol. 30, N 36. P. 6844–6853.
- Testa G., Di Meo C., Nardecchia S., Capitani D. et al. Influence of dialkyne structure on the properties of new click-gels based on hyaluronic acid // *Int. J. Pharm.* 2009. Vol. 378, N 1–2. P. 86–92.
- Toemmeras K., Eenschooten C. WO/2007/033677. Aryl/alkyl succinic anhydride hyaluronan derivatives.
- Tomihata K., Ikada Y. Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content // *Biomaterials*. 1997. Vol. 18, N 3. P. 189–195.
- Tomihata K., Ikada Y. Cross-linking of hyaluronic acid with glutaraldehyde // *J. Polym. Sci. Pt A Polym. Chem.* 1997. Vol. 35. P. 3553–3559.
- Uspeskii S.A., Ivanov P.L., Zelenetskii A.N., Selyanin M.A. et al. A novel supramolecular HA/B-10 systems for tumour treatment by boron neutron capture therapies // *News in Chemistry, Biochemistry and Biotechnology*. New York: Nova Science Publishers, 2014.
- Vega S.L., Kwon M.Y., Burdick J.A. Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering // *Eur. Cell Mater.* 2017. Vol. 33. P. 59–75.
- Vercruyse K.P., Marecak D.M., Marecek J.F., Prestwich G.D. Synthesis and in vitro degradation of new polyvalent hydrazide cross-linked hydrogels of hyaluronic acid // *Bioconjug. Chem.* 1997. Vol. 8. P. 686–694.
- Vil'danova R.R., Sigaeva N.N., Volodina V.P., Spirikhin L.V. et al. Modification of hyaluronic acid and chitosan, aimed at developing hydrogels for ophthalmologyrusian // *J. Appl. Chem.* 2014. Vol. 87, N 10. P. 1547–1557.
- Wada T., Chirachanchai S., Izawa N. Synthesis and properties of hyaluronic acid conjugated nucleic acid analogs-1: synthesis of deacetylhyaluronan and introduction of nucleic acid bases // *J. Bioact. Compat. Polym.* 1994. Vol. 9. P. 429–447.
- Wei K., Zhu M., Sun Y., Xu J. et al. Robust biopolymeric supramolecular «host-guest macromer» hydrogels reinforced by in situ formed multivalent nanoclusters for cartilage regeneration // *Macromolecules*. 2016. Vol. 49. P. 866–875.

- Wells L.A., Furukawa S., Sheardown H. Photoresponsive PEG-anthracene grafted hyaluronan as a controlled-delivery biomaterial // *Biomacromolecules*. 2011. Vol. 12. P. 923–932.
- Xia Y.-G., Liang J., Yang B.-Y., Wang Q.-H. et al. A new method for quantitative determination of two uronic acids by CZE with direct UV detection // *Biomed. Chromatogr.* 2011. Vol. 25. P. 1030–1037.
- Xiao L., Tong Z., Chen Y., Pochan D.J. et al. Hyaluronic acid-based hydrogels containing covalently integrated drug depots: implication for controlling inflammation in mechanically stressed tissues // *Biomacromolecules*. 2013. Vol. 14. P. 3808–3819.
- Yeom Y., Highley C.B., Bellas E., Ito T. et al. In situ cross-linkable hyaluronic acid hydrogels prevent post-operative abdominal adhesions in a rabbit model // *Biomaterials*. 2006. Vol. 27. P. 4698–4705.
- Yeom J., Bhang S.H., Kim B.-S., Seo M.S. et al. Effect of cross-linking reagents for hyaluronic acid hydrogel dermal fillers on tissue augmentation and regeneration // *Bioconj. Chem.* 2010. Vol. 21. P. 240–247.
- Ying L., Sun J.A., Jiang G.Q., Jia Z. et al. In vitro evaluation of lysozyme-loaded microspheres in thermosensitive methylcellulose-based hydrogel // *Chin. J. Chem. Eng.* 2007. Vol. 15, N 4. P. 566–572.
- Young J., Cheng K., Tsou T., Liu H. et al. Preparation of cross-linked hyaluronic acid film using 2-chloro-1-methylpyridinium iodide or water-soluble 1-ethyl-(3,3-dimethylaminopropyl)carbodiimide // *J. Biomat. Sci.* 2004. Vol. 15, N 6. P. 767–780.
- Yu Y., Lau L.C.M., Lo A.C.-Y., Chau Y. Injectable chemically cross-linked hydrogel for the controlled release of bevacizumab in vitreous: a 6-month in vivo study // *Transl. Vis. Sci. Technol.* 2015. Vol. 4, N 2. P. 5.
- Yui N., Okano T., Sakurai Y. Regulated release of drug microspheres from inflammation-responsive degradable matrixes of cross-linked hyaluronic acid // *J. Control. Release*. 1993. Vol. 25. P. 133–143.
- Zhang L.-M., Wu C.-X., Huang J.-Y., Peng X.-H. et al. Synthesis and characterization of a degradable composite agarose/HA hydrogel // *Carbohydr. Polym.* 2012. Vol. 88, N 4. P. 1445–1452.
- Zhao L., Gwon H., Lim Y., Nho Y. et al. Hyaluronic acid/chondroitin sulfate-based hydrogel prepared by gamma irradiation technique // *Carbohydr. Polym.* 2014. Vol. 102. P. 598–605.
- Zhao X. WO/2000/046253. Zhaohui Z., Qiang W., Zhidong W., Gangqiao D. et al. Effect of irradiation on physico-chemical properties of hyaluronic acid // *J. Shipin Kexue (Beijing, China)*. 2011. Vol. 32, N 3. P. 117–120.