

Сравнительная оценка биосовместимости губок на основе различных солей хитозана *in vitro*

 Волкова М.В.^{1,2,*},  Ковалевский Я.Б.²,  Ерёмин П.С.¹,  Демченко К.Н.³,
 Гильмутдинова И.Р.¹,  Марков П.А.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России, Москва, Россия

² ООО «Химическая компания «Орион»», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Актуальность исследования обусловлена увеличением количества повреждений кожных покровов человека в результате чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера. Среди природных полимеров, широко используемых для изготовления раневых повязок, применяют хитозан, но его плохая растворимость является технологическим и биологическим ограничением для его эффективного включения и применения в качестве компонента раневых покрытий. Одним из способов решения проблемы является модификация хитозана гликолевой, молочной или аскорбиновой кислотами. Для эффективного и адекватного применения химических модификаций хитозана в качестве материала для раневых покрытий требуется оценить их биосовместимость.

ЦЕЛЬ. Оценка цитотоксичности и гемостатических свойств губок на основе хитозана, модифицированного гликолевой, молочной и аскорбиновой кислотами, *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Губки на основе водорастворимых солей хитозана предоставлены ООО «Химическая компания «Орион»». Биосовместимость полученных изделий оценивали на культуре мезенхимальных стволовых клеток, используя для этого методы световой и люминесцентной микроскопии. Метаболическую активность клеток (МТТ-тест) и сорбционные свойства биоматериалов оценивали методом спектрофотометрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Губки из гликолата или лактата хитозана обеспечивают приживаемость большинства адгезированных клеток, в то время как губки из аскорбата хитозана ингибируют жизнеспособность и рост клеток. Выявлено, что губки из гликолата хитозана обладают наибольшей сорбционной емкостью по крови и способны поглощать свыше 700 мкл крови/см³. Губки из лактата хитозана и аскорбата хитозана демонстрируют сорбционную емкость на уровне 250 мкл крови/см³.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. По результатам исследований для дальнейшей разработки ранозаживляющих покрытий могут быть использованы губки из гликолата или лактата хитозана, обладающие хорошей биосовместимостью *in vitro*. Кроме того, губки из гликолата хитозана могут быть использованы в качестве высокоэффективных гемостатических материалов. Губки из аскорбата хитозана требуют дальнейшей доработки и отдельного изучения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гликолат хитозана, лактат хитозана, аскорбат хитозана, цитотоксичность, гемостатические свойства

Для цитирования / For citation: Волкова М.В., Ковалевский Я.Б., Ерёмин П.С., Демченко К.Н., Гильмутдинова И.Р., Марков П.А. Сравнительная оценка биосовместимости губок на основе различных солей хитозана *in vitro*. Вестник восстановительной медицины. 2024; 23(6):45-53. <https://doi.org/10.38025/2078-1962-2024-23-6-45-53> [Volkova M.V., Kovalevsky Ya.B., Eremin P.S., Demchenko K.N., Gilmudinova I.R., Markov P.A. Comparative Evaluation of the Biocompatibility of Sponges Based on Different Chitosan Salts *in vitro*. Bulletin of Rehabilitation Medicine. 2024; 23(6):45-53. <https://doi.org/10.38025/2078-1962-2024-23-6-45-53> (In Russ.).]

* **Для корреспонденции:** Волкова Марина Викторовна, E-mail: biotech.volkova@list.ru

Статья получена: 20.09.2024
Статья принята к печати: 04.10.2024
Статья опубликована: 16.12.2024

Comparative Evaluation of the Biocompatibility of Sponges Based on Different Chitosan Salts *in vitro*

 Marina V. Volkova^{1,2,*},  Yan B. Kovalevsky²,  Petr S. Eremin¹,  Konstantin N. Demchenko³,
 Ilmira R. Gilmudinova¹,  Pavel A. Markov¹

¹ National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia

² Chemical company "Orion" LTD, Saint-Petersburg, Russia

³ S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia

ABSTRACT

INTRODUCTION. The relevance of the study is due to the increase in the number of human skin lesions as a result of natural and man-made emergencies. Among the natural polymers widely used for the manufacture of wound dressings is chitosan, but its poor solubility is a technological and biological limitation for its effective inclusion and use as a component of wound dressings. One way to solve the problem is to modify chitosan with glycolic, lactic or ascorbic acids. For effective and adequate use of chemical modifications of chitosan as a material for wound dressings, it is necessary to evaluate their biocompatibility.

AIM. *In vitro* assessment of the cytotoxicity and hemostatic properties of sponges based on chitosan modified with glycolic, lactic and ascorbic acids.

MATERIALS AND METHODS. Sponges based on water-soluble chitosan salts were provided by Chemical Company "Orion" LTD. The biocompatibility of the obtained products was assessed on the culture of mesenchymal stem cells, using light and fluorescent microscopy. The metabolic activity of the cells (MTT-test) and the sorption properties of the biomaterials were assessed by spectrophotometry.

RESULTS AND DISCUSSION. Chitosan glycolate or chitosan lactate sponges ensure the survival of most adherent cells, while chitosan ascorbate sponges inhibit cell viability and growth. It was found that chitosan glycolate sponges have the highest blood sorption capacity and are capable of absorbing over 700 μl of blood/ cm^3 . Chitosan lactate and chitosan ascorbate sponges demonstrate a sorption capacity of 250 μl of blood/ cm^3 . However, the ascorbate-based material inhibits the metabolic activity of cells.

CONCLUSION. Based on the research results, sponges made of chitosan glycolate or lactate, which have good biocompatibility *in vitro*, can be used for further development of wound-healing coatings. In addition, sponges made of chitosan glycolate can be used as highly effective hemostatic materials. Sponges made of chitosan ascorbate require further development and separate study.

KEYWORDS: chitosan glycolate, chitosan lactate, chitosan ascorbate, cytotoxicity, hemostatic properties

For citation: Volkova M.V., Kovalevsky Ya.B., Eremin P.S., Demchenko K.N., Gilmudinova I.R., Markov P.A. Comparative Evaluation of the Biocompatibility of Sponges Based on Different Chitosan Salts *in vitro*. Bulletin of Rehabilitation Medicine. 2024; 23(6):45-53. <https://doi.org/10.38025/2078-1962-2024-23-6-45-53> (In Russ.).

* **For correspondence:** Marina V. Volkova, biotech.volkova@list.ru

Received: 20.09.2024

Accepted: 04.10.2024

Published: 16.12.2024

ВВЕДЕНИЕ

Раневые повязки в виде губок остаются одним из наиболее удобных типов повязок. Такой тип раневых покрытий благодаря высокой степени пористости и большой удельной поверхности обеспечивает газопроницаемость и абсорбцию раневого экссудата. При этом губчатые повязки обладают достаточной прочностью и защищают рану от инфицирования и обезвоживания [1]. Одним из популярных биополимеров, уже используемых для изготовления biomaterialов медицинского назначения, является хитозан. Данный полимер применяют для регенерации кожи и костей, также он находит применение в тканевой инженерии [2].

Результаты исследований показывают, что хитозан способен вовлекаться в регенеративные процессы. Так, на начальных стадиях biomaterialы из хитозана не только способствуют остановке кровотечений, но и поддерживают инфильтрацию раневой полости нейтрофилами и макрофагами. Это помогает самоочищению раны от инородных тел и способствует формированию грануляционной ткани [3]. Показано, что хитозан регулирует экспрессию факторов роста, задейство-

ванных в процессе заживления, стимулирует процессы регенерации и способствует уменьшению количества рубцовой ткани на завершающей стадии заживления [4, 5]. Еще одним немаловажным преимуществом хитозана являются его антибактериальные и противогрибковые свойства, которые также способствуют эффективному восстановлению поврежденных тканей [6, 7]. Различные лекарственные формы, содержащие в своем составе хитозан, успешно прошли клинические испытания, в том числе при лечении хронических ран, в частности, диабетической стопы [8].

Кроме биологических свойств хитозан имеет и технологические преимущества, например, он легче подвергается обработке, из него можно изготавливать гидрогели, пленки, волокна и губки. Хитозановые губки имеют типичную пористую структуру и обладают высокой сорбционной способностью [9]. Однако, как известно, хитозан нерастворим в воде, поэтому для получения губчатых структур требуется предварительное его растворение в кислотах, а затем проведение нейтрализации щелочью, что усложняет технологический процесс.

Одним из способов решения проблемы растворимости хитозана является его химическая модификация и его перевод в форму соли [10, 11]. Ранее была показана перспективность данного направления. Так, например, лактат хитозана, наряду с сохранением гемостатических и антибактериальных свойств, приобретает способность растворяться в воде [12–14].

Медицинское применение водорастворимых модификаций хитозана не ограничивается использованием только солей молочной кислоты. Например, перспективной водорастворимой солью может выступать гликолат хитозана. Гликолевая кислота широко используется в косметологии. Кроме того, гликолевая и молочная кислоты являются гидроксильными кислотами схожего размера и имеют похожее поведение при химическом взаимодействии с хитозаном [15].

Кроме молочной и гликолевой кислот для получения водорастворимой формы хитозана может использоваться и аскорбиновая кислота. В пользу перспективности ее использования можно сказать, что аскорбиновая кислота способствует пролиферации клеток и синтезу коллагена. Кроме того, витамин С предотвращает образование рубцов и улучшает функциональность кожного барьера [16, 17].

Для безопасного и эффективного применения водорастворимых модификаций хитозана в качестве материалов для изготовления ранозаживляющих покрытий требуется проведение ряда исследований по оценке биосовместимости производных хитозана с учетом их физико-химических особенностей.

ЦЕЛЬ

Оценка биологического влияния губок на основе хитозана, модифицированного гликолевой, молочной и аскорбиновой кислотами, *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Губки на основе водорастворимых солей хитозана разработаны и предоставлены ООО «Химическая компания «Орион»» и представляют собой пористые структуры, полученные путем лиофильного высушивания.

В работе использовали культуры мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) человека, приобретенные в ООО «Биолот» (г. Санкт-Петербург). Для культивирования клеток использовали питательную среду следующего состава: DMEM/F12 (Biowest, Франция), содержащая 10 % FBS (Biowest, Франция).

Методы

Оценку скорости сорбции и емкости проводили по разработанному для гемостатических губок методикам [18]. Образец площадью 0,5 × 0,5 см инкубировали с 0,2 мл цельной крови, содержащей антикоагулянт (3,8 % цитрат натрия: кровь 1 : 9), в течение 3 или 10 минут. Затем к суспензии осторожно добавляли 1,7 мл деионизированной воды. Жидкую фракцию отбирали и разбавляли дополнительно в 2 раза. Расчеты проводили относительно образца крови, приготовленного аналогичным образом, но без инкубирования ($OD_{\text{кровь}}$). Поглощение растворов определяли при длине волны 540 нм с помощью спектрофотометра FlexA-200

(Allsheng, Китай). Произведен расчет количества абсорбированных эритроцитов по формуле:

$$\Gamma(\%) = 100 - \frac{OD_{\text{образец}}}{OD_{\text{кровь}}} \times 100$$

где OD — значение оптической плотности при 540 нм.

Затем процент абсорбированных эритроцитов был пересчитан в объем поглощенной крови на объем губки.

Оценку адгезивных свойств ММСК характеризовали по количеству и морфологии клеток, прикрепившихся к образцу материала. Для этого фрагменты исследуемых образцов размером 1 × 1 см помещали в 6-луночный планшет и предварительно инкубировали в 5 мл питательной среды в течение суток при комнатной температуре. Среду удаляли и на образцы наносили 100 мкл суспензии ММСК ((4 × 10⁵)–(5 × 10⁵) клеток/мл). Для улучшения визуализации клетки были предварительно окрашены витальным флуоресцентным красителем PKH-26 (Sigma, США). Через 30 минут после нанесения клеток в лунки внесли питательную среду в объеме 5 мл. ММСК с образцами инкубировали 24 ч в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂). Затем образцы извлекали и промывали от неадгезированных клеток. С использованием световой и люминесцентной микроскопии оценивали количество и морфометрические характеристики ММСК. Количество повторов для каждого образца — 3 шт.

Оценку цитотоксичности на клеточной культуре мезенхимальных стволовых клеток проводили с помощью метаболической активности клеток (МТТ-тест) [18]. Губки нарезали на фрагменты размером 1 × 1 см, часть образцов взвешивали для определения средней массы, другую часть образцов инкубировали в питательной среде в течение 24 часов при температуре 37 °C. Параллельно клеточную суспензию (10⁶ кл/мл) вносили в 96-луночный планшет (100 мкл) и в 6-луночный планшет (1 мл), после чего в лунки добавляли эквивалентный объем питательной среды. Через сутки отбирали кондиционированную питательную среду от исследуемых образцов и делали разведения из расчета от 10 до 0,5 мг/мл. По 100 мкл исследуемой питательной среды вносили в лунки 96-луночного планшета к клеткам, предварительно удалив питательную среду, в которой они росли. Каждую концентрацию делали в 4 повторах. Непосредственно образцы после предварительной инкубации в среде переносили в лунки 6-луночного планшета. ММСК культивировали с питательной средой, содержащей экстрагируемые компоненты губок, или непосредственно с губками в течение 24 часов. Затем питательную среду удаляли и вносили 0,5 мг/мл МТТ (Panreac Applichem, Испания) в объеме 100 мкл в 96-луночный планшет или 300 мкл в 6-луночный планшет. Инкубировали при 37 °C в течение 3 часов в среде 5 % CO₂. После питательную среду удаляли, а образовавшийся в клетках формазан растворяли в 200 или 500 мкл диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США) в 96- или 6-луночном планшете. Измерение проводили на спектрофотометре ClarioStar (BMG, Германия) при длине волны 560 нм с референсом 650 нм.

При статистической обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение (M) и среднее квадратичное отклонение (σ). Достоверность различий оценивалась по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Губки из аскорбата, лактата и гликолата хитозана представляют собой пористые объемные структуры коричневого или молочного цвета соответственно (рис. 1). Физико-химические характеристики образцов представлены в таблице 1.

Исследуемые материалы рассматриваются в качестве потенциальных раневых покрытий, поэтому они должны обладать как биосовместимостью, так и способностью сорбировать кровь и раневой экссудат.

Установлено, что губки из различных солей хитозана отличаются по способности абсорбировать эритроциты крови. Наибольшая емкость установлена для изделий на основе гликолата хитозана, свыше

700 мкл/см³ (табл. 1). При этом скорость, выражаемая в качестве доли объема, сорбируемого изделием за 3 минуты по отношению к общей емкости, для гликолата хитозана наименьшая среди образцов (табл. 1). Значительных отличий между лактатом и аскорбатом по критерию сорбции крови не установлено. Оба образца поглощают свыше 200 мкл/см³, при этом около 50 % своей емкости связывают в первые 3 минуты (табл. 1).

При этом стоит отметить, что сорбционная емкость по воде и по крови — это разные характеристики. Гликолат хитозана обладает наименьшей емкостью по воде, но способен поглощать значительно больше биологической жидкости, в частности, крови, чем лак-

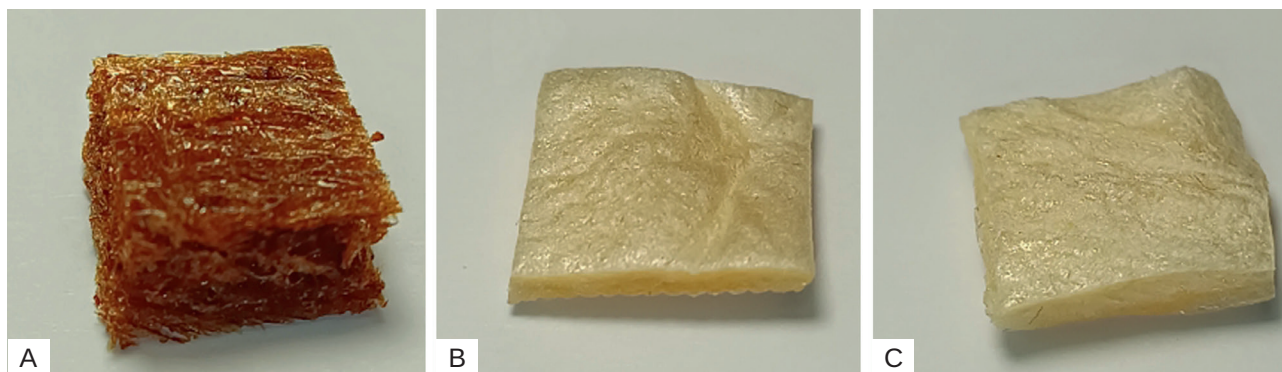


Рис. 1. Внешний вид губок из аскорбата (А), гликолата (В) и лактата (С) хитозана размером 1х1 см²
Fig. 1. Appearance of sponges made of ascorbate (A), glycolate (B) and lactate (C) chitosan size 1x1 cm²

Таблица 1. Физико-химическая характеристика образцов
Table 1. Physical and chemical characteristics of the samples

Показатель / Parameter	Значение / Value		
	Аскорбат хитозана / Ascorbate chitosan	Гликолат хитозана / Glycolate chitosan	Лактат хитозана / Lactate chitosan
Толщина, мм / Thickness, mm	0,5–0,6	0,3 – 0,4	0,4 – 0,5
Плотность (20 °С), г/см ³ / Density (20 °С), g/cm ³	0,16–0,18	0,25 – 0,29	0,22 – 0,26
рН	4,5–5,0	4,3–4,7	4,2–4,8
Сорбционная емкость по воде, г/см ³ / Sorption capacity for water, g/cm ³	1,0–1,2	0,5–1,7	2,0–3,0
Сорбционная емкость по крови, мкл/см ³ / Sorption capacity for blood, mkl/cm ³	220–354	721–917	220–280
Скорость сорбции (доля объема крови, сорбируемая за 3 минуты), % / Sorption rate (proportion of blood volume sorbed in 3 minutes), %	35–55	9–37	46–68

тат или аскорбат хитозана. Тем не менее все материалы обладают потенциалом применения с целью удаления избытка раневого экссудата и крови.

Удаление избытка раневого экссудата и поддержание кондиционированной среды в раневой полости соответствует общим стратегиям, способствующим заживлению ран [19]. Кроме того, стимуляция гемостаза и очистка ран являются условием предотвращения возникновения и развития инфекций. Известно, что хитозан является катионным полимером, благодаря чему он способен взаимодействовать с клетками и белками, в первую очередь, сорбируя их. Положительное действие хитозана на заживление ран показано во многих исследованиях [3, 20].

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что разработанные материалы не уступают по сорбционным свойствам губкам, изготовленным из немодифицированного хитозана.

Биосовместимость материалов определяли путем инкубации образцов с клеточными культурами ММСК. На первом этапе оценивали ответ клеток на взаимодействие с поверхностью биоматериалов.

Хорошо известно, что адгезия клеток к субстрату играет важную роль во многих процессах, связанных с репаративной регенерацией тканей, включая мигра-

цию и пролиферацию, а также ангиогенез [13, 21, 22]. Установлено, что через 24 часа инкубации количество клеток, адгезированных на поверхности губок из гликолата хитозана и лактата хитозана, сопоставимо с контролем (рис. 2, 4А). Выявлено, что губки из аскорбата хитозана не поддерживают клеточную адгезию, количество клеток составляет менее 20 % от контрольных значений (рис. 2, 4А).

Оценка морфометрических характеристик клеток, инкубированных в присутствии биоматериалов, также показала, что губки из гликолата хитозана и лактата хитозана не оказывают ингибирующего действия на рост и трансформацию клеток (рис. 3, 4В). Как и ожидалось, биоматериалы из аскорбата хитозана ингибируют жизнеспособность клеточной культуры ММСК (рис. 3, 4В).

Данные микроскопического исследования показывают, что губки из гликолата и лактата хитозана не оказывают ингибирующего действия на адгезию и рост клеток. Губки из аскорбата хитозана ингибируют адгезию и рост клеток, в связи с чем оценка их влияния на метаболическую активность клеток методом МТТ-теста не проводилась.

Таким образом, модификация хитозана гликолевой или молочной кислотами не приводит к повышению токсичности материала. Также, как и другие изделия



Рис. 2. Фото клеток, окрашенных DAPI, через 12 часов инкубации: А — контроль, В — гликолат хитозана, С — лактат хитозана, D — аскорбат хитозана. Шкала 200 мкм

Fig. 2. The photo of cells stained with DAPI after a 12 h of incubation: A — control, B — chitosan glycolate, C — chitosan lactate, D — chitosan ascorbate. Scale bar 200 μm

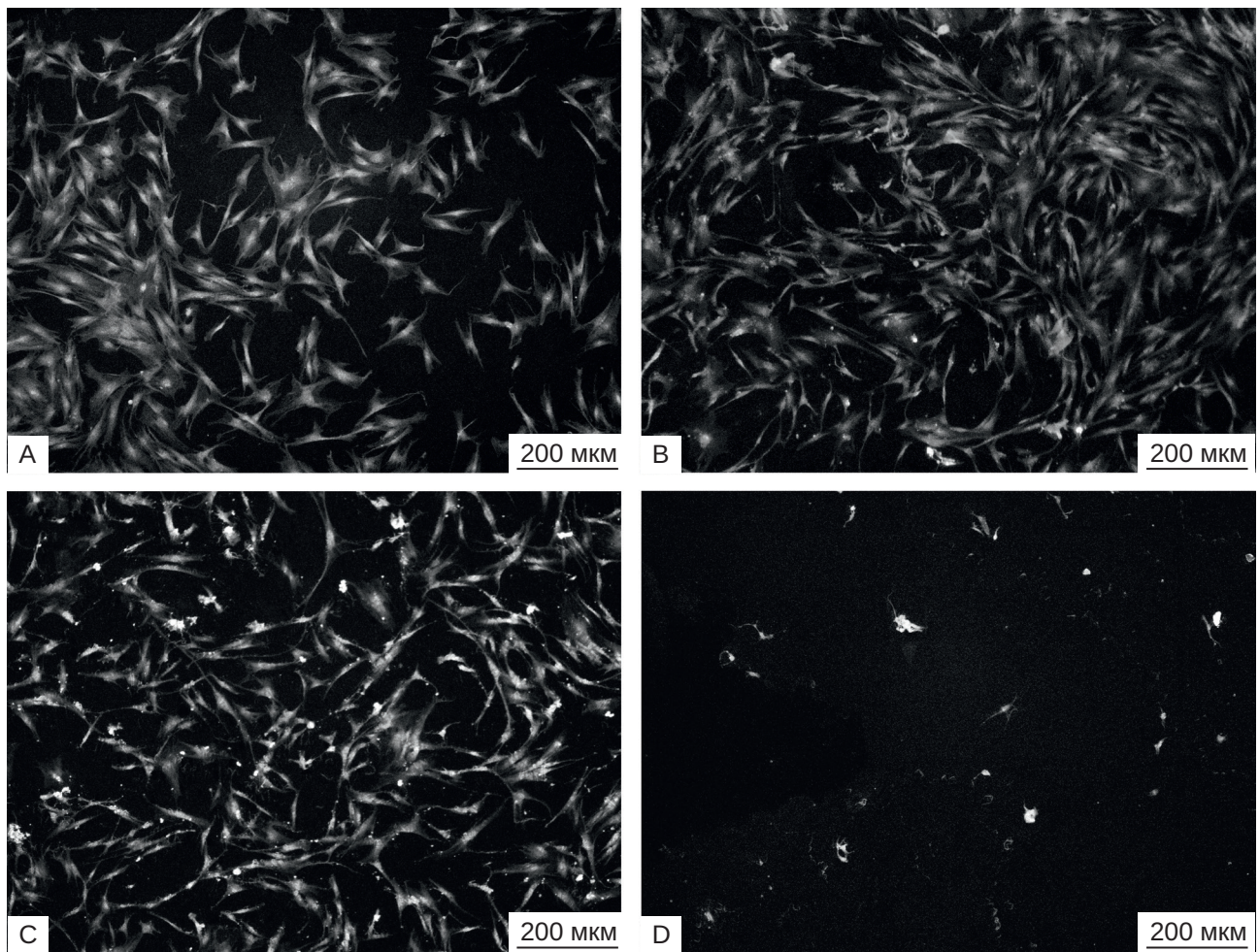


Рис. 3. Фото клеток, окрашенных родамином, через 24 часа инкубации: А — контроль, В — гликолат хитозана, С — лактат хитозана, D — аскорбат хитозана. Шкала 200 мкм

Fig. 3. The photo of cells stained with rhodamine after a 24 h of incubation: A — control, B —chitosan glycolate, C — chitosan lactate, D — chitosan ascorbate. Scale bar 200 μm

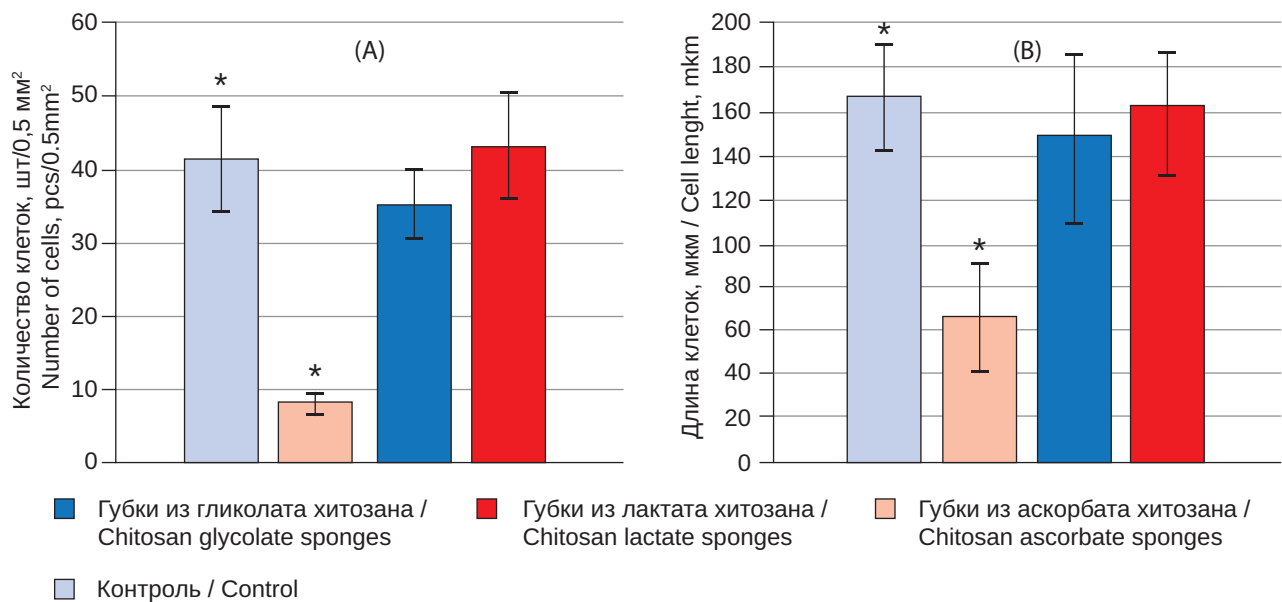


Рис. 4. Результаты микроскопии: количество клеток, адгезированных на материале в течение 12 ч (А). Длина клеток через сутки инкубации в интактной питательной среде и в средах с экспериментальными образцами (В). Данные представлены в виде среднего ± SD, $n = 10$, * — $p < 0,05$ по сравнению с количеством или длиной клеток в контроле

Fig. 4. Microscopy results: the number of cells adhered to the material during the first day (A), as well as the length of the cells after one day of incubation in an intact nutrient medium or in media with experimental samples (B). Data are presented as mean ± SD, $n = 10$, * — $p < 0.05$ compared to the number or length of cells in the control

на основе хитозана [23, 24], модифицированные гликолевой и молочной кислотой хитозановые губки способствуют прикреплению клеток и не вызывают их гибели. Негативное влияние аскорбата хитозана на клеточную культуру может быть обусловлено избытком остатков аскорбиновой кислоты, которые в высокой концентрации могут оказывать цитотоксическое действие [25].

Культивирование клеток с губками из лактата или гликолата хитозана, которые предварительно были инкубированы в течение суток в питательной среде, не показало изменений в метаболической активности ММСК: для губок из гликолата хитозана она составила (101 ± 6 %), для губок из лактата хитозана — (98 ± 4 %) по сравнению с контролем (100 %). Следует отметить, что применение губок в качестве ранозаживляющих покрытий не подразумевает предварительной подготовки изделий перед их нанесением на раневую поверхность. В связи с этим важно оценить и цитотоксичность компонентов, которые экстрагируются из материала. С этой целью дополнительно изучено влияние на метаболическую активность кондиционированных питательных сред, которые были получены в ходе предварительной инкубации образцов в питательной среде.

Исследование влияния на метаболическую активность губок из гликолата хитозана показало, при кон-

центрации 10 мг/мл наблюдается гибель свыше 80 %, что соответствует сильному цитотоксическому действию. При этом разбавление кондиционированной питательной среды до 8 мг/мл и менее демонстрирует значительное влияние на метаболическую активность клеток (рис. 5). Это может быть обусловлено тем, что при концентрации 10 мг/мл визуально отмечается высокая кислотность среды, а при дальнейшем разбавлении значения pH повышается до стандартного 7,0–7,5. Губки из лактата хитозана демонстрируют пролиферативный эффект во всем диапазоне исследуемых концентраций, несмотря на то что при концентрации 10 мг/мл также отмечается высокая кислотность среды. Повышение метаболической активности ММСК может быть обусловлено экстракцией биологически активных компонентов из состава губок как самого хитозана, так и соответствующих кислотных остатков.

Таким образом, полученные результаты показывают, что модификация хитозана молочной и гликолевой кислотой не снижает биосовместимость биоматериалов. Влияние лактат- и гликолат-модифицированных форм хитозана на метаболическую активность клеток сопоставимо с ранее изученными и уже применяемыми в медицинской практике гемостатическими пластырями на основе хитина, например Beschitin (Unitika), Syvek Patch (Marine Polymer Technologies), Chitopoly (Fuji Spinning) и др. [26].

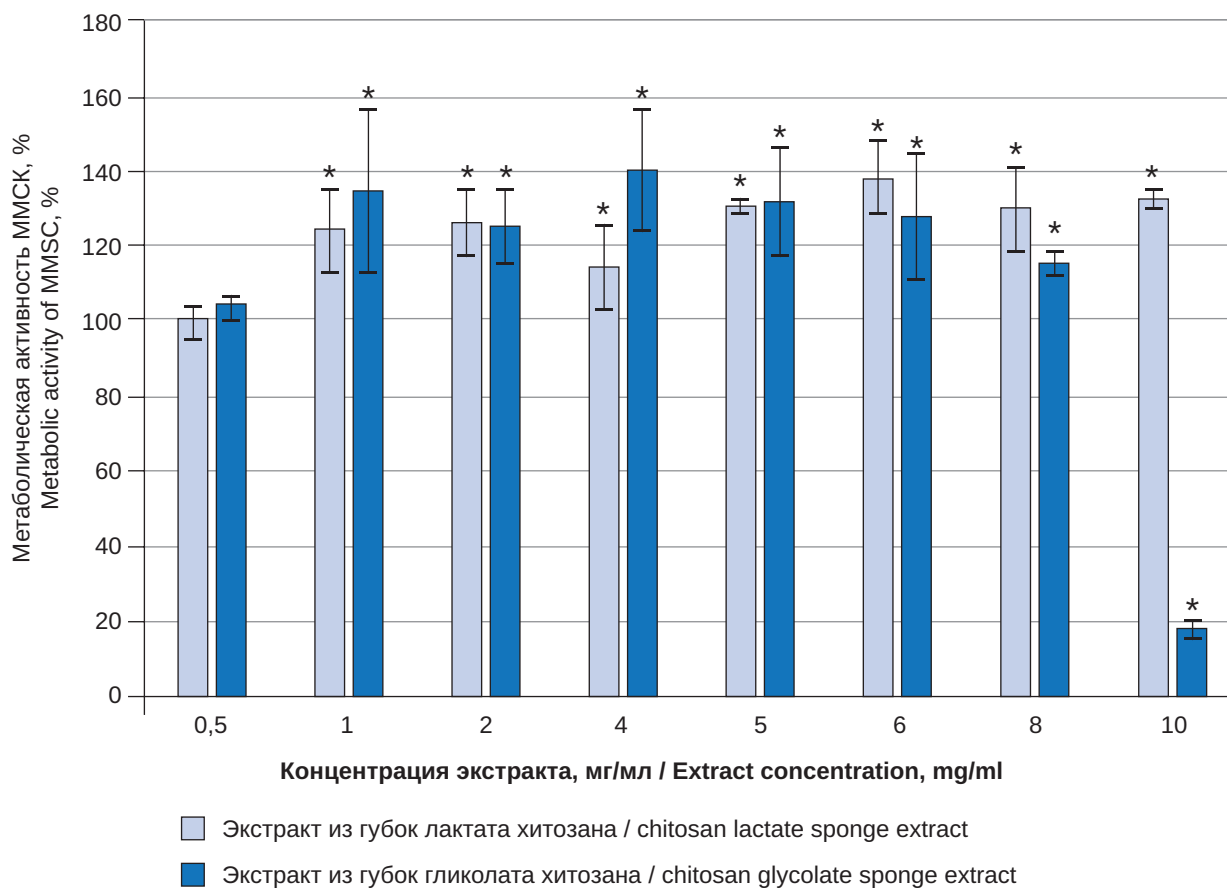


Рис. 5. Метаболическая активность ММСК после инкубации с экстрактами губок из лактата или гликолата хитозана. Данные представлены в виде среднего \pm SD, $n = 5$. * — $p < 0,05$ по сравнению с метаболической активностью клеток в контроле

Fig. 5. Metabolic activity of MMSC after incubation with sponge extract from chitosan lactate or glycolate chitosan. The data are presented as the mean \pm SD, $n = 5$. * — $p < 0.05$ compared to the metabolic activity of cells in the control

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Каждый новый материал, предназначенный для использования в биомедицинской сфере, должен быть досконально изучен с целью оценки его цитотоксичности и биосовместимости. Каждая новая модификация материалов, используемых в клинической практике, может изменить их цитотоксическую активность. Поэтому в данном исследовании оценивали влияние модифицированных водорастворимых форм хитозана — лактата, гликолата и аскорбата хитозана на гемостатические свойства и цитотоксичность.

В проведенной работе было установлено, что губки из лактата или гликолата хитозана обладают хорошей биосовместимостью и поддерживают жизнеспособность

ММСК. Кроме того, найдено, что экстракты губок оказывают стимулирующее действие на метаболическую активность ММСК. Согласно полученным результатам, можно утверждать, что губки из гликолата или лактата хитозана являются перспективными изделиями для дальнейшей разработки ранозаживляющих покрытий. Для подтверждения терапевтической эффективности необходимо проведение дальнейших экспериментов *in vivo*.

В то же время неожиданной оказалась выявленная цитотоксичность губок из аскорбата хитозана. Поэтому, несмотря на хорошие сорбционные характеристики, их использование в качестве компонентов раневых покрытий на сегодня без проведения дополнительных исследований не рекомендуется.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Волкова Марина Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник, отдел биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России; заместитель генерального директора по науке и разработкам, ООО «Химическая компания “Орион”».

E-mail: biotech.volkova@list.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5966-3026>

Ковалевский Ян Борисович, генеральный директор, ООО «Химическая компания “Орион”».

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-8561-5040>

Ерёмин Петр Серафимович, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, отдел биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8832-8470>

Демченко Константин Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории (военной хирургии), научно-исследовательский центр, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5437-1163>

Гильмутдинова Ильмира Ринатовна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, отдел биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6743-2615>

Марков Павел Александрович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, отдел биомедицинских

технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4803-4803>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают свое авторство в соответствии с международными критериями ICMJE (все авторы внесли значительный вклад в концепцию, дизайн исследования и подготовку статьи, прочитали и одобрили окончательный вариант до публикации). Наибольший вклад распределен следующим образом: Волкова М.В. — научное обоснование, проведение экспериментов, подготовка рукописи; Ковалевский Я.Б. — научное обоснование, проведение экспериментов; Ерёмин П.С. — проведение экспериментов; Демченко К.Н. — проведение экспериментов; Гильмутдинова И.Р. — редактирование текста статьи; Марков П.А. — анализ данных, редактирование текста статьи.

Источники финансирования. Данное исследование не было поддержано никакими внешними источниками финансирования.

Конфликт интересов. Ковалевский Я.Б. — генеральный директор ООО «Химическая компания “Орион”», Волкова М.В. — заместитель генерального директора по науке и разработкам ООО «Химическая компания “Орион”». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Доступ к данным. Данные, подтверждающие выводы этого исследования, можно получить по обоснованному запросу у корреспондирующего автора.

ADDITIONAL INFORMATION

Marina V. Volkova, Ph.D. (Biol.), Researcher, Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Deputy General Director for Science and Development, Chemical company “Orion” LTD.

E-mail: biotech.volkova@list.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5966-3026>

Yan B. Kovalevsky, General Director, Chemical company “Orion” LTD.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-8561-5040>

Petr S. Eremin, Researcher, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Biomedical Technologies,

National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8832-8470>

Konstantin N. Demchenko, Ph.D. (Med.), Senior Researcher, Research Laboratory (Military Surgery) Research Center, S.M. Kirov Military Medical Academy.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5437-1163>

Ilmira R. Gilmutdinova, Ph.D. (Med.), Leading Researcher, Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6743-2615>

Pavel A. Markov, Ph.D. (Biol.), Leading Researcher, Department

of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4803-4803>

Author Contributions. All authors confirm their authorship in accordance with the international ICMJE (all authors made significant contributions to the concept, study design and preparation of the article, read and approved the final version before publication). Special contribution: Volkova M.V. — conceptualization, investigation, writing; Kovalevsky Ya.B. — conceptualization, investigation; Eremin P.S. — investigation; Demchenko K.N. — investigation; Gilmutdinova I.R. —

review and editing; Markov P.A. — data analysis, review and editing.

Funding. The authors declare no external funding in the conduct of the study.

Disclosure. Kovalevsky Ya.B. — General Director of Chemical company “Orion” LTD, Volkova M.V. — Deputy General Director for Science and Development of Chemical company “Orion” LTD. Other authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Data Access Statement. The data supporting the conclusions of this are available upon reasonable request from the corresponding author.

Список литературы / References

- Hao Y, Zhao W, Zhang L, et al. Bio-multifunctional alginate/chitosan/fucoidan sponges with enhanced angiogenesis and hair follicle regeneration for promoting full-thickness wound healing. *Materials & Design*. 2020; 193: 108863. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.108863>
- Alaribe F.N., Manoto S.L., Motaung S.C.K.M. Scaffolds from biomaterials: advantages and limitations in bone and tissue engineering. *Biologia*. 2016; 71 (4): 353–366. <https://doi.org/10.1515/biolog-2016-0056>
- Xu X., Zeng Y., Chen Z., et al. Chitosan-based multifunctional hydrogel for sequential wound inflammation elimination, infection inhibition, and wound healing. *International journal of biological macromolecules*. 2023; 235: 123847. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123847>
- Парамонов Б.А., Антонов С.Ф., Абрамов Н.А. и др. Влияние имплантируемых коллаген-хитозановых и желатин-хитозановых губок на состояние организма крысы: экспериментальное исследование. *Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова*. 2012; 19(3): 77–81. [Paramonov B.A., Antonov S.F., Abramov N.A., et al. The effect of collagen-chitosan and gelatin-chitosan sponges on general condition of rats. *The Scientific Notes of the Pavlov University*. 2012; 19(3): 77–81 (In Russ.)]
- Patrulea V., Ostafe V., Borchard G., et al. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015; 97: 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.004>
- Maged A., Abdelkhalek A.A., Mahmoud A.A., et al. Mesenchymal stem cells associated with chitosan scaffolds loaded with rosuvastatin to improve wound healing. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019; 127: 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.11.002>
- Nicholas M.N., Jeschke M.G., Amini-Nik S. Methodologies in creating skin substitutes. *Cellular and molecular life sciences*. 2016; 73: 3453–3472. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2252-8>
- Bardill J.R., Laughter M.R., Stager M., et al. Topical gel-based biomaterials for the treatment of diabetic foot ulcers. *Acta biomaterialia*. 2022; 138: 73–91. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.10.045>
- Han F., Dong Y., Su Z., et al. Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin–chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014; 476(1–2): 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.036>
- Zhu Y., Zhang Y., Zhou Y. Application progress of modified chitosan and its composite biomaterials for bone tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(12): 6574. <https://doi.org/10.3390/ijms23126574>
- Fourie J., Taute F., du Preez L., et al. Chitosan composite biomaterials for bone tissue engineering — a review. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. 2020: 1–21. <https://doi.org/10.1007/s40883-020-00187-7>
- Madni A., Khan R., Ikram M. et al. Fabrication and characterization of chitosan–vitamin c–lactic acid composite membrane for potential skin tissue engineering. *International Journal of Polymer Science*. 2019; 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4362395>
- Pieklarz K., Galita G., Tylman M., et al. Physico-chemical properties and biocompatibility of thermosensitive chitosan lactate and chitosan chloride hydrogels developed for tissue engineering application. *Journal of Functional Biomaterials*. 2021; 12(2): 37. <https://doi.org/10.3390/jfb12020037>
- Jiang Y., Tang X., Li T., et al. Chitosan Lactate Particles for Non-Compression Hemostasis on Hepatic Resection. *Polymers*. 2023; 15(3): 656. <https://doi.org/10.3390/polym15030656>
- de Souza Soares L., Perim R.B., de Alvarenga E.S., et al. Insights on physicochemical aspects of chitosan dispersion in aqueous solutions of acetic, glycolic, propionic or lactic acid. *International journal of biological macromolecules*. 2019; 128: 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.106>
- Ghahremani-Nasab M., Del Bakhshayesh A.R., Akbari-Gharalari N., et al. Biomolecular and cellular effects in skin wound healing: the association between ascorbic acid and hypoxia-induced factor. *Journal of Biological Engineering*. 2023; 17(1): 62. <https://doi.org/10.1186/s13036-023-00380-6>
- Vivcharenko V., Wojcik M., Palka K., et al. Highly porous and superabsorbent biomaterial made of marine-derived polysaccharides and ascorbic acid as an optimal dressing for exuding wound management. *Materials*. 2021; 14(5): 1211. <https://doi.org/10.3390/ma14051211>
- Волкова М.В., Носов А.М., Головко К.П. и др. Характеристика лактата хитозана, пригодного для остановки внутриполостных кровотечений. *Биотехнология*. 2024; 40(3): 88–94. <https://doi.org/10.56304/S0234275824030098> [Volkova M.V., Nosov A.M., Golovko K.P., et al. Characteristics of chitosan lactate suitable for stopping intracavitary bleeding. *Biotechnologiya*. 2024; 40(3): 88–94. <https://doi.org/10.56304/S0234275824030098> (In Russ.)]
- Zheng K., Tong Y., Zhang S., et al. Flexible bicolorimetric polyacrylamide/chitosan hydrogels for smart real-time monitoring and promotion of wound healing. *Advanced Functional Materials*. 2021; 31(34): 2102599. <https://doi.org/10.1002/adfm.202102599>
- Sang F., Liu C., Yan J., et al. Polysaccharide- and protein-based hydrogel dressings that enhance wound healing: A review. *International journal of biological macromolecules*. 2024; 280(1): 135482. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135482>
- Jiang D., Rinkevich Y. Scars or Regeneration? Dermal Fibroblasts as Drivers of Diverse Skin Wound Responses. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(2): 617. <https://doi.org/10.3390/ijms21020617>
- Katoh K. FAK-Dependent Cell Motility and Cell Elongation. *Cells*, 2020; 9(1): 192. <https://doi.org/10.3390/cells9010192>
- Cao J., Wu P., Cheng Q., et al. Ultrafast fabrication of self-healing and injectable carboxymethyl chitosan hydrogel dressing for wound healing. *ACS applied materials & interfaces*. 2021; 13(20): 24095–24105. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.1c02089>
- Hu S., Bi S., Yan D., et al. Preparation of composite hydroxybutyl chitosan sponge and its role in promoting wound healing. *Carbohydrate polymers*. 2018; 184: 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.033>
- Jagetia G.C., Rajanikant G.K., Baliga M.S., et al. Augmentation of wound healing by ascorbic acid treatment in mice exposed to γ -radiation. *International journal of radiation biology*. 2004; 80(5): 347–354. <https://doi.org/10.1080/09553000410001692744>
- Muzzarelli R.A., Morganti P., Morganti G., et al. Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments. *Carbohydrate Polymers*. 2007; 70(3): 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.04.008>