

На правах рукописи

АРХАРОВА НАТАЛЬЯ АНДРЕЕВНА

**СТРУКТУРА КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ  
GLUCONACETOBACTER XYLINUS  
И НАНОЧАСТИЦ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ**

Специальность 01.04.18 – кристаллография, физика кристаллов

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва 2017

Работа выполнена в лаборатории электронографии Института кристаллографии им. А. В. Шубникова Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр» «Кристаллография и фотоника» РАН.

**Научный руководитель:**

**Клечковская Вера Всеволодовна**, доктор физико-математических наук, профессор, заведующая лабораторией электронографии ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

**Официальные оппоненты:**

**Аронин Александр Семенович**, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией структурных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физики твердого тела РАН

**Кузьмичева Галина Михайловна**, доктор химических наук, профессор Федерального государственного бюджетного учреждения высшего профессионального образования "Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова"

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г. в \_\_\_ ч. \_\_\_ мин. на заседании диссертационного совета Д 002.114.01 при ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН по адресу: 119333, г. Москва, Ленинский проспект, 59, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН <http://crys.ras.ru/>.

Автореферат разослан: «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 002.114.01  
кандидат физико-математических наук

К. В. Фролов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность работы

Анализ научной и патентной литературы показывает, что в последние годы во многих лабораториях развитых стран отмечается значительное повышение интереса к полисахаридам, в частности к целлюлозе как основному возобновляемому биополимеру на Земле. Это подтверждается изданием в Лондоне с 1994 года специального международного журнала *Cellulose*. Широко известные нарушения экологии в биосфере и постоянно возрастающая потребность многочисленных применений целлюлозы делают ее дефицитным продуктом и требуют поиска альтернативных источников получения по сравнению с общепринятыми. На данном этапе предпочтение в большей степени отдается изучению бактериальной целлюлозы. В отличие от растительной бактериальная целлюлоза может образовывать механически прочную нано-гель-пленку с удельной внутренней поверхностью не менее 500 м<sup>2</sup>/г и способна к не достижимому для растительной целлюлозы удержанию воды (соотношение полимер/вода ~1/100). В последнее время интенсифицировались исследования ее тонких структурных особенностей с использованием биохимических, генетических, физико-химических и теоретических методов.

Уникальная структура и свойства бактериальной целлюлозы позволяют находить ей широчайшее применение: ее используют в изготовлении акустических мембран, биотоплива, материалов медицинского и другого назначения [1, 2]. Показана возможность создания на основе бактериальной целлюлозы композитов, содержащих в своем составе другие полимеры и неорганические вещества, которые позволяют управлять их свойствами. Материалы на основе бактериальной целлюлозы исследуются и апробируются во многих странах мира, некоторые из них нашли коммерческое применение.

Отечественная целлюлоза *Glucanacetobacter xylinus* (ЦГХ) синтезируется в Санкт-Петербургском государственном университете (штамм N 169 GALU), где отработана технология ее получения при статическом культивировании [3], не требующая больших капиталовложений благодаря дешевым компонентам питательной среды, что позволяет рассматривать ЦГХ как экономически эффективный материал.

Нано-гель-пленка ЦГХ представляет собой пористую 3D-структуру, состоящую из кристаллических микрофибрилл, и является перспективной матрицей-носителем практически любых лекарственных препаратов. Таким образом она может быть использована, например, в качестве раневого покрытия при ожоговых, радиационных и механических травмах. Для этого в нее внедряют, например, наночастицы серебра, селена, меди и др., обладающие антимикробной, антивирусной, противоопухолевой, противовоспалительной и репаративной активностью [4- 8].

Кроме того, в качестве прекурсора костной ткани перспективным считается композит на основе ЦГХ и нанокристаллов гидроксиапатита (ГАП), обладающий биосовместимостью с живыми организмами [9-11]. Возможность

направленного синтеза ЦГХ и включения в нее разнообразных добавок позволяет рассматривать такие композиты в качестве универсального биоматериала для костной и тканевой инженерии в целом. На основе ЦГХ уже получен искусственный хрящ, превосходящий по свойствам аналоги, и апробирован прекурсор костной ткани, показывающий хорошую совместимость в опытах на животных [12].

Однако до осуществления клинических испытаний необходимо провести детальные исследования структуры как отдельных компонентов, так и композитов в целом, что поможет в объяснении поведения материала в *in vitro* и *in vivo* исследованиях.

**Целью диссертационной работы** является детальное изучение структурно-морфологических характеристик нано-гель-пленок целлюлозы *Glucanacetobacter xylinus* и композитов на ее основе с внедренными наноконструкциями селена, а также нанокристаллами гидроксиапатита.

В соответствии с поставленной целью в работе решались **следующие задачи**:

- Определение морфологии и структуры исходной и дезинтегрированной нано-гель-пленки ЦГХ.
- Изучение изменений в структуре нано-гель-пленки целлюлозы ГХ в процессе интеркаляции в нее наноконструкций селена, стабилизированных поливинилпирролидоном.
- Исследование структуры и морфологии композитов ЦГХ/ ГАП, полученных тремя способами с разными массовыми соотношениями компонентов:
  1. Механическим смешиванием водных суспензий ЦГХ и ГАП;
  2. Путем синтеза нанокристаллов ГАП в водной среде с добавлением суспензии ЦГХ;
  3. Путем синтеза ЦГХ в присутствии нанокристаллов ГАП в питательной среде.
- Определение влияния способа получения и соотношения компонентов композитов ЦГХ/ГАП на физико-химические характеристики композитов.

#### **Научная новизна работы**

- Впервые установлены различия в морфологии и структуре исходной нано-гель-пленки ЦГХ и пленок, полученных высушиванием суспензий дезинтегрированной нано-гель-пленки ЦГХ.
- Обнаружено, что введение в нано-гель-пленку ЦГХ наночастиц из растворов, содержащих одновременно ионы Se и Ag, приводит к образованию в композите нанокристаллов Se, Ag<sub>2</sub>Se и нанопроволок Se на его поверхности.
- Предложен новый метод получения композита ЦГХ/ГАП, состоящий в образовании нанокристаллов ГАП в присутствии в растворе фрагментов нано-гель-пленки целлюлозы. Показано, что изменение массовой доли

целлюлозы в растворе позволяет управлять размерами нанокристаллов гидроксиапатита.

- Получен композитный материал на основе дезинтегрированной целлюлозы и нанокристаллов гидроксиапатита с управляемыми физико-химическими характеристиками.

### **Практическая значимость работы**

Проведенные биологические исследования композитов на основе ЦГХ/ГАП, полученных разными способами, свидетельствуют об отсутствии токсичности, что является положительным показателем к проведению дальнейших доклинических испытаний. В работе предложен метод приготовления материалов на основе ЦГХ/ГАП в качестве костного имплантата с контролируемым градиентом физико-химических характеристик для целенаправленного замещения естественной кости. Использование в качестве матрицы-носителя дезинтегрированной ЦГХ открывает возможность проводить 3D-принтирование данного материала для воссоздания точной копии костного аналога.

Композитные материалы на основе nano-гель-пленки ЦГХ/Se рассматриваются в качестве раневого покрытия, апробацию которого планируется осуществить в Военно-медицинской академии на кафедре термических поражений, а также в Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования на кафедре скорой помощи в качестве перевязочных материалов нового поколения с широким профилем фармакологической активности.

### **Основные результаты и научные положения, выносимые на защиту:**

- При статическом культивировании nano-гель-пленки ЦГХ морфология ее поверхностей, обращенных наружу и в питательный раствор, различна. В связи с этим адсорбция и проникновение наночастиц в архитектуру nano-гель-пленки через разные поверхности существенно отличаются.
- Введение в nano-гель-пленку ЦГХ наночастиц из растворов, содержащих одновременно ионы Se и Ag, приводит к образованию в композите нанокристаллов тригонального Se, ромбического  $Ag_2Se$  и нанопроволок тригонального Se на его поверхности.
- В композитах ЦГХ/ГАП, полученных тремя различными способами, нанокристаллы ГАП ориентируются направлением [0001] вдоль цепи фибрилл ЦГХ.
- В композитных пленках, полученных на основе суспензии ЦГХ, установлена корреляционная зависимость плотности, модуля упругости, пористости и площади удельной поверхности от массовой доли ЦГХ, что открывает возможность управления физико-химическими свойствами материалов ЦГХ/ГАП.

### **Личный вклад диссертанта**

Автор принимала участие в получении композитных материалов на основе ЦГХ/nano-Se, ЦГХ/nano-ГАП и самостоятельно готовила образцы для структурных исследований. Микрофотографии композитов, а также ВРЭМ

изображения отдельных наночастиц были получены автором лично на микроскопах FEI Tecnai G<sup>2</sup> 30ST и FEI Tecnai Osiris (ИК РАН, г. Москва), FEI Titan 80-300 с probe-корректором (НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва). Автор самостоятельно отрабатывала методику съемки поверхностей нано-гель-пленок ЦГХ на сканирующих электронных микроскопах FEI Quanta 200 3D и FEI Scios (ИК РАН, г. Москва), анализируя полученные результаты, сравнивая их с теоретическими расчетами и оптимизируя метод низковольтной СЭМ для исследования морфологии ЦГХ, а также композитов на ее основе. Полученные электронно-микроскопические результаты были обработаны автором с помощью пакета программ Digital Micrograph Software 1.84 (Gatan Inc., Pleasanton), JEMS (Stadelmann, 2015), TIA ES Vision 4.8 (FEI).

Автор обобщала основные результаты проведенных исследований, участвовала в написании статей и представлении докладов на конференциях.

### **Апробация результатов работы**

Результаты работы были доложены на молодежных конкурсах Института кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН в 2007 и 2015 гг., одна из которых была удостоена премии имени академика Н. В. Белова.

Основные результаты работы были опубликованы в 5 статьях, входящих в перечень ВАК, и представлены на следующих конференциях: VI и VII Национальной конференции по применению рентгеновского, синхротронного излучений, нейтронов и электронов для исследования наноматериалов и наносистем (Москва, 2007, 2009), Открытой школе-конференции стран СНГ «Ультрамелкозернистые и наноструктурные материалы» (Уфа, 2008), III Международной конференции по коллоидной химии и физико-химической механике (Москва, 2008), 14-th European Microscopy Congress (Aachen, Germany, 1-5 September, 2008), 6-th, 8-th, 9-th International Symposium (St. Petersburg, 2008, 2014, 2017), XVI и XIX Российском симпозиуме по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел (Черноголовка, 2009, 2015), V-th International Symposium “Design and synthesis of supramolecular architectures” (Kazan, 12-16 October, 2009), XXV, XXVI Российской конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, 2014, 2016), VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), Второй всероссийской молодежной научно-технической конференции «Инновации в материаловедении» (Москва, 2015), 29-th European Crystallographic Meeting (Croatia, 2015), Симпозиуме «Химия для биологии, медицины, экологии и сельского хозяйства» (Санкт-Петербург, 2014), 20-й Международной пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2016), Первой российской конференции «Физика - наукам о жизни» (Санкт-Петербург, 2016), Седьмой всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2017» (Москва, 2017).

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из Введения, пяти глав, Заключения и Списка литературы из 187 наименований. Общий объем диссертации – 142 страницы, включая 61 рисунок и 5 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** приведена общая характеристика работы, обоснована актуальность исследований, сформулированы цели и задачи работы, показаны научная новизна и практическая значимость, изложены основные положения выносимые на защиту и представлены сведения об апробации работы.

В **первой главе** описаны методы исследования полимерных материалов, позволяющие определить степень их кристалличности, провести фазовый и структурный анализ, выявить наличие текстуры, описать структуру с различными конформациями молекул, а также изучить морфологические особенности полимеров и композитов на их основе.

Проведен анализ литературных данных о структуре гель-пленки бактериальной целлюлозы, ее свойств и морфологии. Рассмотрены способы получения композитных материалов на основе гель-пленки целлюлозы и наночастиц различной природы с целью придания ей антимикробных, иммуностимулирующих и других лечебных свойств.

Описано строение естественной костной ткани от макро- до наноуровня, уточнены особенности взаимодействия коллагеновой и минеральной составляющих, а также размеры нанокристаллов ГАП в костной ткани с помощью методов просвечивающей и криогенной просвечивающей электронной микроскопии. Проведен сравнительный анализ керамических материалов на основе фосфатов кальция и естественной костной ткани. Показано, что композиты на основе фосфатов кальция и различных полимеров обладают улучшенными механическими характеристиками по сравнению с чистыми кальций-фосфатными материалами. Описаны способы получения композитов на основе гель-пленки бактериальной целлюлозы и нанокристаллов гидроксиапатита в качестве перспективного костного имплантата, отмечены их преимущества и недостатки.

Во **второй главе** описаны методы получения исходных и композитных материалов, оборудование и методы их структурной диагностики, а также методы исследований физико-химических свойств образцов.

Синтез наночастиц селена проводили восстановлением селенистой кислоты аскорбиновой кислотой в присутствии поливинилпирролидона (ПВП) по методике, описанной в [5]. Получение коллоидного раствора, содержащего одновременно ионы селена и серебра, осуществляли путем добавления следовых количеств серебра в процессе синтеза наночастиц селена. При этом варьировали концентрацию растворов ПВП-Se от 0,01 до 1%. Для приготовления композитов на основе ЦГХ и наночастиц нано-гель-пленку отжимали, помещали в коллоидный раствор с частицами и выдерживали в течение 15 минут.

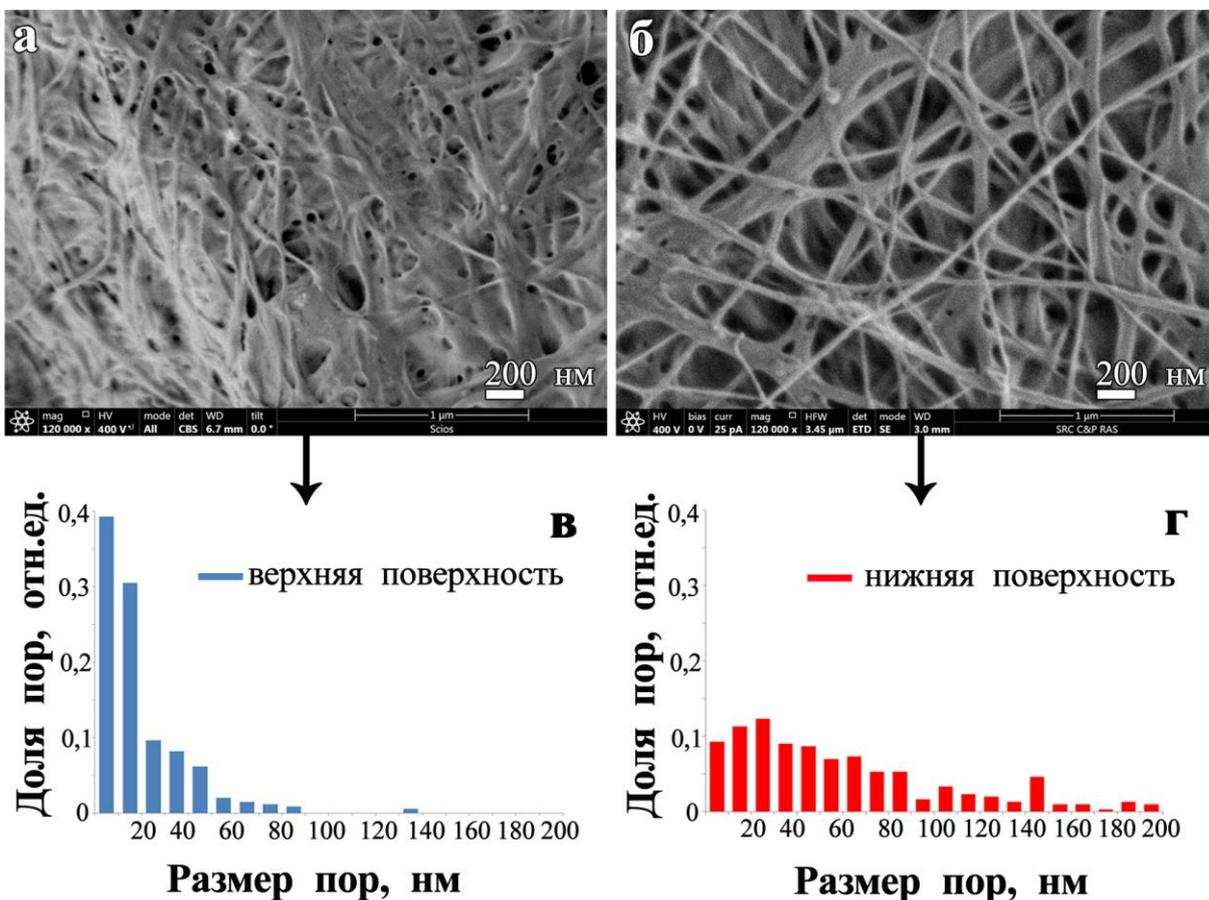
Синтез нанокристаллов ГАП осуществлялся на кафедре радиохимии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова под руководством А.В. Северина по отработанной методике, описанной в [13]. Композиты на основе ЦГХ и ГАП были получены тремя способами с использованием дезинтегрированной нано-гель-пленки ЦГХ, варьируя соотношения

компонентов. Такой подход обусловлен поиском материала, наиболее приближенного по структуре и свойствам к естественной костной ткани.

Исследование наноструктурных особенностей поверхности исходной нано-гель-пленки ЦГХ и композитов на ее основе было проведено с помощью сканирующей электронной микроскопии на микроскопах Scios FEI, Quanta 200 3D FEI (ИК РАН) с применением описанных методик низковольтной СЭМ. Фазовый анализ массивных образцов (размером до нескольких мм), выявление наличия текстуры в композитах, а также определение наиболее вероятных кристаллических плоскостей, создающих межфазные контакты, проводили на рентгеновских дифрактометрах ДРОН-2 и ДРОН-3М ( $\text{CuK}_\alpha$ -излучение, фильтрованное никелем). Локальный фазовый анализ, выявление наличия текстуры осуществляли в электронографе ЭМР-102. Изображения срезов композитов ЦГХ/нано-Se, ЦГХ/нано-Se-Ag, наночастиц ГАП на волокнах целлюлозы и композитов ЦГХ/ГАП были получены с помощью просвечивающих электронных микроскопов FEI Tecnaï G<sup>2</sup>, FEI Tecnaï Osiris при ускоряющих напряжениях 200 -300 кВ. Визуализация отдельных наночастиц Se и наночастиц ГАП с атомным разрешением проводилась в электронных микроскопах FEI Osiris, FEI Titan 80-300 с probe-корректором при ускоряющем напряжении 80 кВ. Использование низкого ускоряющего напряжения позволило получить изображения наночастиц вплоть до атомного уровня без радиационных повреждений. Фазовый состав наночастиц в композитах был исследован с помощью электронной микро- и нанодифракции. Элементный состав композитов определялся методом энергодисперсионного рентгеновского микроанализа. Получение EDX-спектров отдельных наночастиц и их скоплений, количественное описание спектров осуществлялись в программе TIA ES Vision 4.1. Анализ электронограмм и их интерпретация, обработка ВРЭМ-изображений, включая фильтрацию шума на изображениях и построение преобразований Фурье, были проведены в программе DigitalMicrograph 3.8.2. Моделирование картин электронной дифракции, совмещение расчетных и экспериментальных электронограмм на экспериментальные, моделирование ВРЭМ-изображений в зависимости от толщины, дефокуса и наклона образца были проведены в программе JEMS (Java Electron Microscopy). Толщина кристаллов в композитах была определена с помощью моделирования ВРЭМ-изображений, используя традиционное приближение блоховских волн (алгоритм Бете).

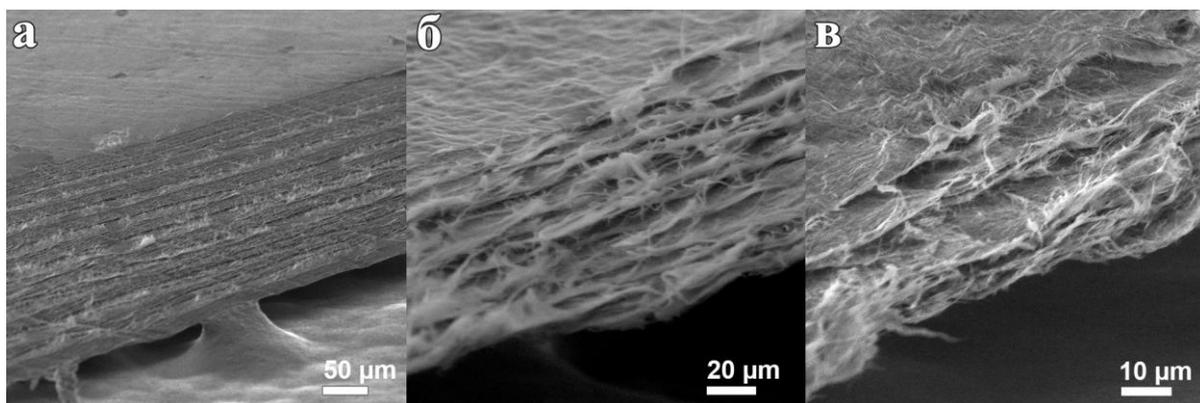
В **третьей главе** описан подход, оптимизирующий проведение СЭМ-анализа диэлектрических пленок на основе целлюлозы GX. Экспериментально определена энергия баланса заряда на поверхности ЦГХ, равная  $E_2=400$  эВ, что позволило детально исследовать морфологию поверхности нано-гель-пленки ЦГХ и композитов на ее основе без предварительного напыления защитного покрытия на поверхность образца, приводящего к искажению реальной структуры объекта. Расчеты значения глубины проникновения электронов в нано-гель-пленку ЦГХ показали, что сигналы вторичных и обратно рассеянных электронов детектируются с приповерхностного слоя глубиной менее 4 нм.

СЭМ-изображения поверхностей нано-гель-пленки ЦГХ приведены на Рис.1. На верхней поверхности нано-гель-пленки ЦГХ формируются поры диаметром от нескольких единиц нанометров до ста нанометров, при этом основная доля пор имеет размер до 20 нм. Нижняя поверхность гель-пленки представляет собой «губку» из взаимопроникающих пор разного диаметра от нескольких нанометров до 500 нм с преимущественным размером пор 10-50 нм.



**Рис.1.** СЭМ-изображения верхней (обращенной вверх в питательном растворе) (а) и нижней (обращенной в питательный раствор) (б) поверхностей нано-гель-пленки ЦГХ. Гистограммы распределения пор по размерам на верхней (в) и нижней (г) поверхностях нано-гель-пленки ЦГХ.

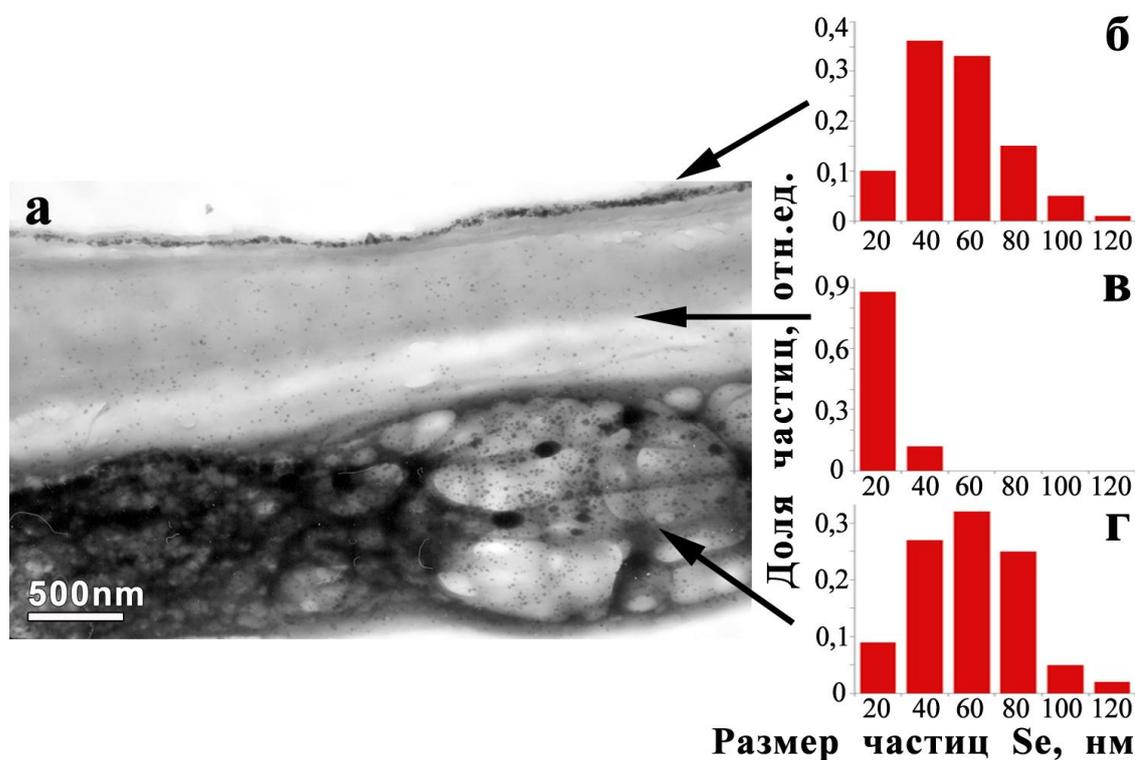
Дезинтегрирование нано-гель- пленки в лабораторном блендере приводит к образованию фрагментов микрофибрилл и лент ЦГХ в водном растворе со средним размером 500 мкм (для скорости вращения 2 000 об./мин) и 300 мкм (для скорости вращения 15 000 об./мин). Анализ полученных изображений нано-гель-пленки ЦГХ позволяет сделать заключение об эффекте самосборки фрагментов целлюлозы в водных суспензиях: преимущественная ориентация фибрилл, присущая исходной гель-пленке, в высушенных пленках из дезинтегрированной целлюлозы восстанавливается (Рис.2). При этом среднее значение пор на поверхности высушенных пленок дезинтегрированной ЦГХ составляет ~20 нм, поры больших размеров (более 150 нм) не наблюдаются.



**Рис.2.** Изменение микроструктуры боковой и верхней поверхности исходной нано-гель-пленки ЦГХ (а) и пленок, полученных из суспензий после ее дезинтегрирования при 2 000 об./мин (б) и 15 000 об./мин (в).

В четвертой главе представлены результаты исследования особенностей взаимодействия матрицы на основе нано-гель-пленки целлюлозы с наполнительным компонентом на примере наночастиц, стабилизированных полимером. Контроль наличия побочных образований и взаимных структурных изменений особенно важен при переходе к созданию медицинских изделий на их основе ЦГХ.

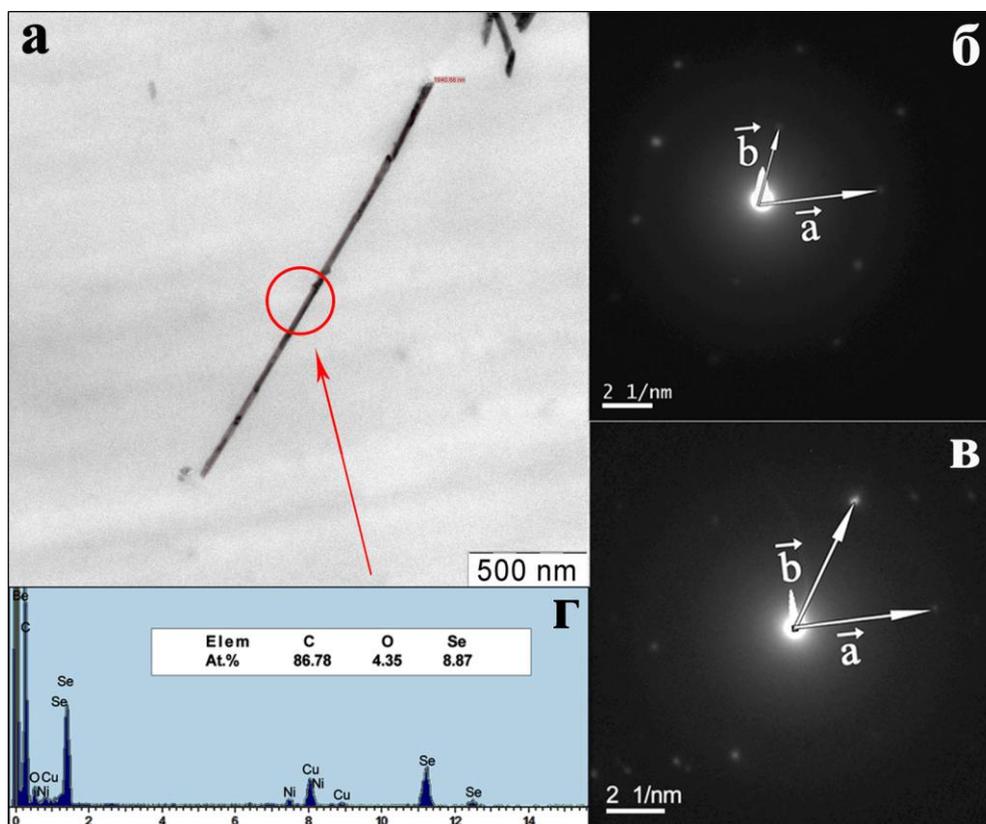
ПЭМ-изображение тонкого среза нано-гель-пленки ЦГХ с сорбированными наночастицами Se приведено на Рис.3.



**Рис.3.** ПЭМ-изображение поперечного сечения гель-пленки ЦГХ/наноселен (а). Гистограммы распределения наночастиц по размерам на поверхности (б), в глубине (в) и в нижней части (г) нано-гель-пленки ЦГХ.

Анализ микроструктуры пленок показал, что интеркаляция наночастиц Se в nano-гель-пленку ЦГХ происходит по-разному относительно верхней и нижней поверхностей, что связано с особенностями строения ЦГХ, формирующейся в процессе биосинтеза. На верхней поверхности пленки локализуются кластеры частиц в основном крупных размеров, от 20 до 60 нм. Гистограмма распределения наночастиц Se в глубине пленке имеет узкую ширину с максимумом в интервале от нескольких нанометров до 20 нм. Это связано с наличием определенного размера пор в микрофибриллярной сетке на верхней поверхности nano-гель-пленки, средний размер которых, по данным СЭМ, составляет  $\sim 10 - 20$  нм. Таким образом, верхняя поверхность гель-пленки обладает свойствами мембраны, позволяющей фильтровать наночастицы по размерам. Нижняя поверхность гель-пленки ЦГХ имеет достаточно большие межфибриллярные пустоты, что позволяет проникать наночастицам Se больших размеров, вплоть до 120 нм, глубоко в объем матрицы.

Обнаружено, что при введении в nano-гель-пленку ЦГХ наночастиц из растворов, содержащих одновременно ионы Se и Ag, в матрице ЦГХ наблюдаются эллипсоидальные наночастицы, представляющие собой смесь кристаллитов селена тригональной модификации с параметрами элементарной ячейки  $a=b=4,35 \text{ \AA}$ ,  $c=4,96 \text{ \AA}$ ,  $\gamma = 120^\circ$ , и селенида серебра ромбической модификации с параметрами ячейки  $a=4,333 \text{ \AA}$ ,  $b=7,062 \text{ \AA}$ ,  $c=7,764 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ . На поверхности композита, выдержанного в 1%-ном растворе ПВП-Se, выявлены нанопроволоки чистого Se длиной до нескольких микрон (Рис.4).

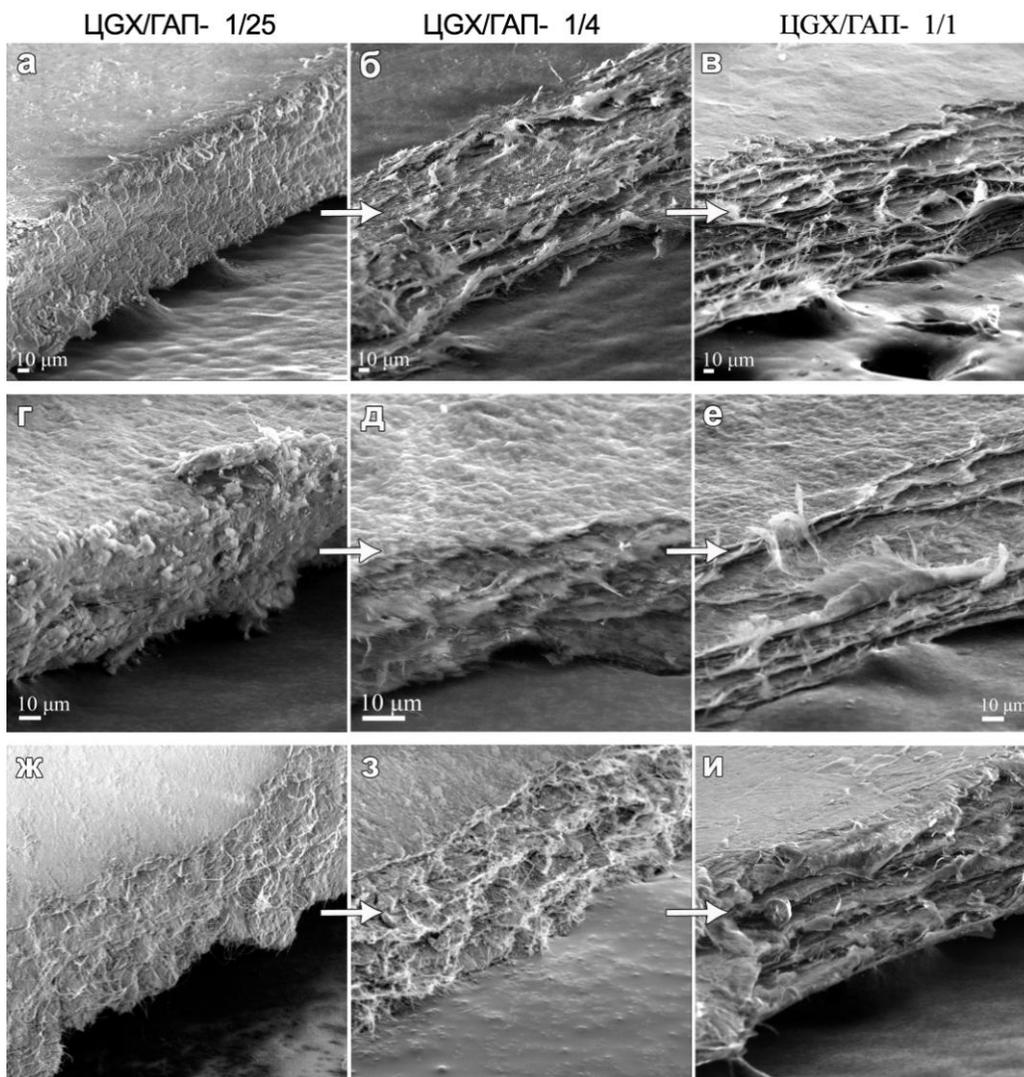


**Рис.4.** ПЭМ-изображение нанопроволоки селена (а) и картины электронной дифракции от неё, полученные при вращении образца на угол  $0.6^\circ$  (б),  $10.6^\circ$  (в). ЭДС-спектр от нанопроволоки (г).

Фазовый анализ нанопроволок селена был проведен с помощью дифракции электронов методом вращения. Дифракционные картины от нанопроволоки на просвет представлены на Рис.4 б, в. Полученные электронограммы сравнивали с моделированными в программе JEMS для известных фаз селена. Межплоскостные расстояния на электронограммах были измерены в программе Digital Micrograph, при этом ошибка измерений составила 1% для углов между векторами обратной решетки и 3% для межплоскостных расстояний. В результате проведенного сравнения дифракционные картины были расшифрованы в моноклинной и тригональной модификациях селена. Уточнение фазы селена было произведено путем расчета угла между осями зон для моделированных дифракционных картин, соответствующих электронограммам Рис. 4. б, в. Наилучшее совпадение расчетных и экспериментальных электронограмм было получено для тригональной модификации селена с параметрами элементарной ячейки  $a=b=4,36\text{Å}$ ,  $c=4,95\text{Å}$ ,  $\gamma=120^\circ$ . Угол между осями зон для тригональной фазы селена равен  $10^\circ$ , что хорошо согласуется с экспериментальным углом вращения образца ( $\sim 10^\circ$ ), относительно пучка электронов.

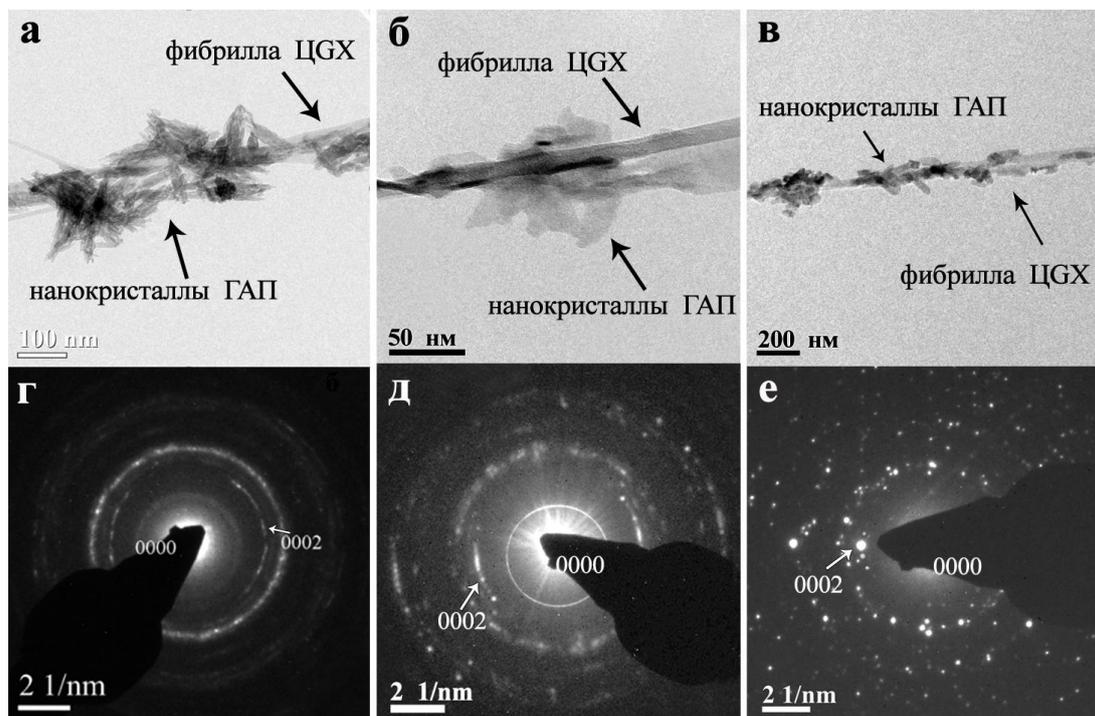
В пятой главе приведены результаты исследования структуры и свойств композитов на основе матрицы-полимера ЦГХ и нанокристаллов ГАП, полученных тремя способами с варьированием соотношений компонентов: 1) механическим смешиванием водных суспензий ЦГХ и ГАП; 2) путем синтеза нанокристаллов ГАП в водной среде с добавлением суспензии ЦГХ; 3) путем синтеза ЦГХ в присутствии нанокристаллов ГАП в питательной среде. На СЭМ-изображениях боковых разрывов высушенных пленок на основе ЦГХ/ГАП, полученных разными способами и с разным соотношением компонентов (Рис.5). Видно, что наночастицы гидроксиапатита располагаются как между «листами» ЦГХ, так и в плоскости «листа» на фибриллах, образуя агломераты. Однако абсолютно гомогенной структуры не наблюдается: агломераты нанокристаллов гидроксиапатита, не закрепившиеся на фибриллах ЦГХ, располагаются в объеме образца неравномерно. Стоит отметить, что при увеличении массовой доли ЦГХ в композите морфология боковых сколов становится подобной пленке, сформированной из дезинтегрированной при 2000 об./мин nano-гель-пленке ЦГХ (Рис.2.б).

На Рис.6 представлены ПЭМ-изображения нанокристаллов гидроксиапатита на отдельных фибриллах целлюлозы и соответствующие электронограммы. Из геометрического анализа электронограмм и распределения интенсивности вдоль колец следует, что наночастицы гидроксиапатита располагаются на фибриллах ЦГХ преимущественно направлением  $[0001]$  вдоль длинной оси фибрилл бактериальной целлюлозы во всех композитах (Рис.6). Такое взаимное расположение компонентов в композитах ЦГХ/ГАП аналогично расположению нанокристаллов ГАП на поверхности фибрилл коллагена в естественной костной ткани [14].

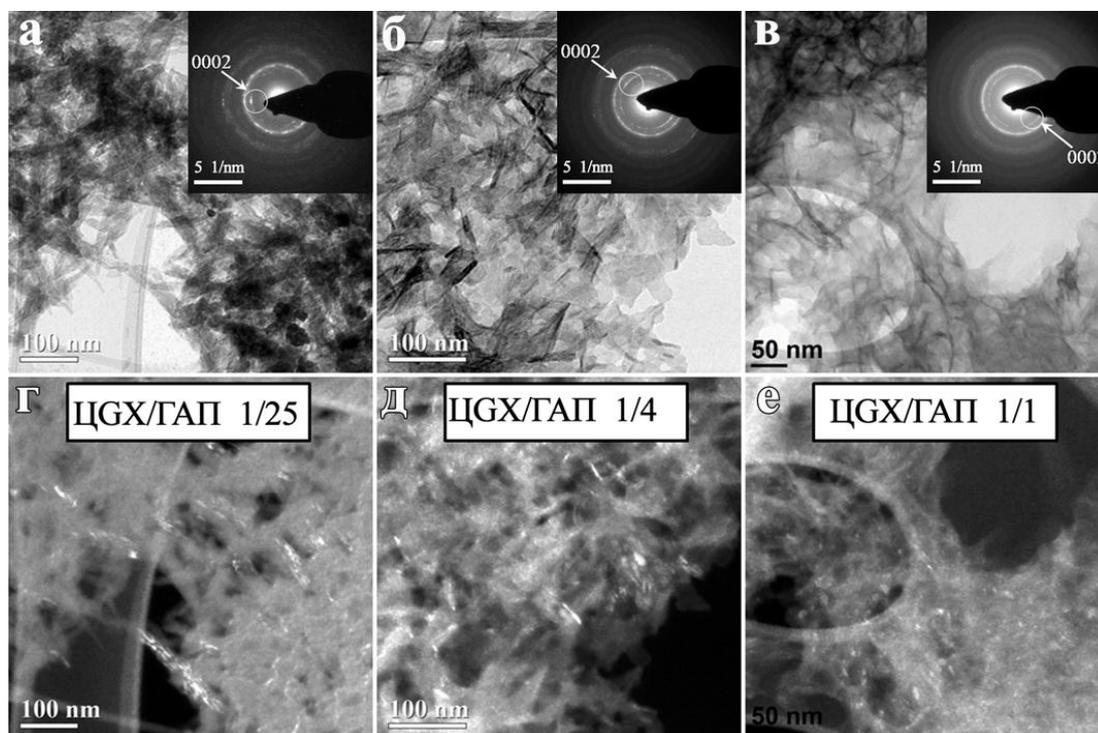


*Рис.5. СЭМ-изображения боковых сколов пленок ЦГХ/ГАП и их внутренней структуры при увеличении массовой доли бактериальной целлюлозы в композитах, полученных механическим смешиванием суспензий ЦГХ и ГАП (а, б, в), путем синтеза нанокристаллов ГАП в водной среде с добавлением суспензии ЦГХ (г,д,е), путем синтеза ЦГХ в присутствии нанокристаллов ГАП в питательной среде (ж,з,и).*

Для оценки линейных размеров нанокристаллов ГАП вдоль направления [0001] были получены темнопольные изображения в рефлексе 0002. Обнаружено, что длина синтезированных наночастиц ГАП со средним размером 25 нм составляет от 5 до 100 нм. Длина наночастиц в композитах, полученных при синтезе ГАП в среде с фрагментами целлюлозы, уменьшается с увеличением массовой доли целлюлозы: средняя длина для композита с соотношением ЦГХ/ГАП = 1/25 составляет 9 нм, для 1/4 - 7 нм, для 1/1 – 5,5 нм (Рис.7). Линейные размеры нанокристаллов ГАП в композитах, полученных третьим способом, составили от нескольких нанометров до 100 нм, что соответствует размерам изначально синтезированных нанокристаллов ГАП. Таким образом, значения длин нанокристаллов ГАП, полученных вторым способом, сопоставимы с размерами нанокристаллов ГАП в костной ткани, находящихся в интервале от нескольких нанометров до 60 нм [15, 16].



**Рис.6.** ПЭМ-изображения отдельных фибрилл целлюлозы GX и нанокристаллов ГАП в композитах, полученных механическим смешиванием суспензий ЦGX и ГАП (а), путем синтеза нанокристаллов ГАП в водной среде с добавлением суспензии ЦGX (б), путем синтеза ЦGX в присутствии нанокристаллов ГАП в питательной среде (в) и соответствующие картины электронной дифракции (г, д, е).

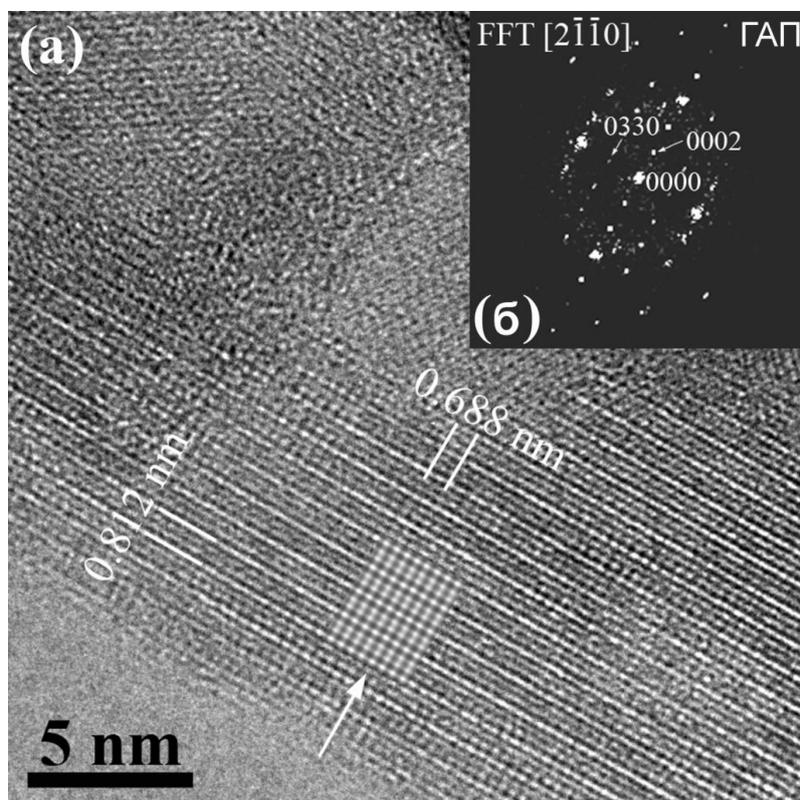


**Рис.7.** ПЭМ-изображения композитов ЦGX/ГАП, полученных путем синтеза ГАП в водной среде с добавлением суспензии ЦGX с соотношениями компонентов: 1/25 (а), 1/4 (б), 1/1 (в) и соответствующие темнопольные изображения (г, д, е), полученные в рефлексе 0002.

Толщина нанокристаллов ГАП была оценена с помощью ВРЭМ-моделирования. Для этого были получены ВРЭМ-изображения от отдельно лежащих нанокристаллов ГАП, ориентированных вдоль направления  $[2-1-10]$  относительно падающего электронного пучка. После чего в программе JEMS было проведено моделирование ВРЭМ-изображений для выбранного направления в зависимости от величины дефокуса и значения толщины кристалла и проведены сравнения с экспериментально полученными изображениями для установления наилучшего соответствия. ВРЭМ-изображение кристалла ГАП в композите ЦГХ/ГАП  $=1/25$  вдоль направления  $[2-1-10]$ , расположенного на краю агломерата, представлено на Рис.8.

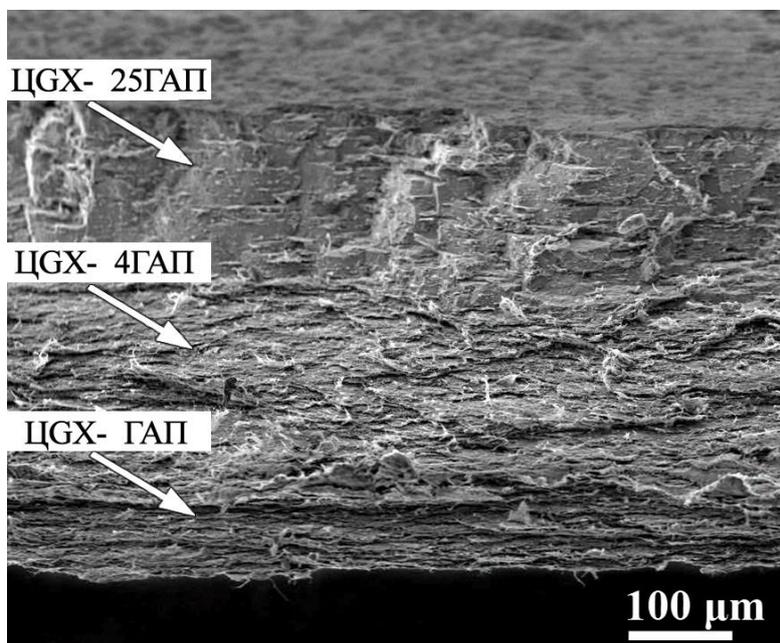
После сравнения экспериментального изображения с моделированными, рассчитанными для оси зоны  $[2-1-10]$ , учитывали возможный наклон образца относительно точной оси зоны, а также параметры вибрации по осям  $x$  и  $y$ . Наилучшее соответствие было найдено для расчетных изображений при значении толщины  $4.05 - 4.86$  нм (5-6 параметров ячейки), значении дефокуса  $61$  нм при угле наклона  $1.46^\circ$  относительно оси зоны  $[2-1-10]$  в направлении рефлекса  $00\bar{7}$  и параметрах вибрации  $x=0.07$ ,  $y=0.07$ .

Проведение ВРЭМ моделирования для нанокристаллов ГАП вдоль направления  $[2-1-10]$  в композитах с другими массовыми соотношениями показало, что толщина нанокристаллов ГАП не изменяется и составляет приблизительно  $4$  нм, что коррелирует с данными о толщине нанокристаллов в костной ткани (от  $2$  до  $10$  нм) [15, 16].



**Рис.8.** ВРЭМ-изображение нанокристалла ГАП в композите ЦГХ/ГАП  $1/25$ , полученное вдоль направления  $[2-1-10]$  (а) и дифрактограмма от него (б). Соответствующее моделированное ВРЭМ-изображение дано на вставке.

С помощью методов БЭТ, БДХ и проведения механических испытаний образцов было найдено, что увеличение массовой доли целлюлозы в композите ЦГХ/ГАП приводит к увеличению их плотности, прочности и уменьшению пористости независимо от способа получения композита. На Рис.9 представлен образец смешанного композита ЦГХ/ГАП, состоящий из слоев с разным соотношением компонентов.



**Рис.9.** СЭМ-изображение бокового скола композита ЦГХ/ГАП с разным соотношением компонентов (сверху вниз): слой ЦГХ/ГАП 1/25 (верх), ЦГХ/ГАП 1/4 (середина), ЦГХ/ГАП 1/1 (низ).

Таким образом, показано, что применение различных способов синтеза и варьирования соотношения компонентов дает возможность управляемо получать различные композитные материалы, обладающие свойствами, необходимыми для биомедицинского применения.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

- Определены наноструктурные особенности морфологии поверхностей исходной гель-пленки целлюлозы GX и пленки, сформированной из дезинтегрированной целлюлозы. Текстура, т.е. преимущественная ориентация микрофибрилл, присущая исходным пленкам на основе ЦГХ, сохраняется и после ее дезинтегрирования. Проведена количественная оценка размеров пор на противоположных поверхностях нано-гель-пленки с целью получения данных о матрице-носителе до наполнения ее наночастицами.
- Показано, что в композите ЦГХ/нано-ПВП-Se распределение наночастиц на поверхностях и в глубине нано-гель-пленки обусловлено ее морфологическими особенностями.

- Выявлено, что при введении в нано-гель-пленку ЦГХ наночастиц из растворов, содержащих одновременно ионы Se и Ag, в матрице нано-гель-пленки ЦГХ образуются эллипсоидальные наночастицы, представляющие собой смесь кристаллитов селена тригональной модификации и селенида серебра ромбической модификации. На поверхности композита, выдержанного в 1%-ном растворе ПВП-Se, выявлены нанопроволоки тригонального селена длиной до нескольких микрон.
- Изучены особенности структуры композитов на основе ГАП/ЦГХ, сформированных тремя различными способами. Во всех случаях наблюдается адсорбция наночастиц, в процессе которой ось *c* кристаллов ГАП ориентируется на плоскости (-110) вдоль цепи микрофибрилл ЦГХ. Установлено, что при увеличении массовой доли ЦГХ в растворе при синтезе ГАП в среде ЦГХ происходит уменьшение размеров наночастиц ГАП.
- Получена корреляционная зависимость физико-химических характеристик композитов ЦГХ/ГАП от способа приготовления композита и соотношения компонентов, что позволяет целенаправленно управлять их свойствами.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kalia S. Cellulose-based bio- and nanocomposites: A Review / Kalia S., Dufresne A., Cherian B., Kaith B., Averous L, Njuguna J., Nassiopoulos E.// Int. J. Polym. Science. – 2011. - V. 2011. – P. 1-35.
2. Keshk S. Bacterial cellulose production and its industrial applications / Keshk S. // J. Bioprocessing and Biotechniques. – 2014. – V.4. – P. 1-10.
3. Хрипунов А.К. Состав питательной среды культивирования *Acetobacter xylinum* для получения бактериальной целлюлозы / Хрипунов А.К., Ткаченко А.А. // Патент РФ № 2189394. Оpubл. 20.09.2002.
4. Афиногенов Г.Е. Водорастворимая сереброросодержащая бактерицидная композиция и способ ее получения / Афиногенов Г.Е., Копейкин В.В., Панарин Е.Ф. // Патент РФ № 2128047.
5. Копейкин В.В. Синтез наночастиц селена в водных растворах поливинилпирролидона и морфологические характеристики образующихся нанокомпозитов / Копейкин В.В., Валуева С.В., Киппер А.И., Боровикова Л.Н., Филиппов А.П. // Высокомолек. соед. А. – 2003. – Т.45. – С. 615-622.
6. Хрипунов А.К. Формирование композита на основе наночастиц  $Se^0$ , стабилизированных поливинилпирролидоном, и гель-пленок целлюлозы *Acetobacter xylinum* / Хрипунов А.К., Ткаченко А.А., Баклагина Ю.Г., Боровикова Л.Н., Нилова В.К., Смыслов Р.Ю., Клечковская В.В., Матвеева Н.А., Волков А.Я., Лаврентьев В.К., Вылегжанина М.Э., Суханова Т.Е., Копейкин В.В. // Ж. прикл. химии. – 2007. – Т.80. – С. 1516-1524.

7. Cady N.C. Copper-based Nanostructured coatings on natural cellulose:nanocomposites exhibiting rapid and efficient inhibition of a multy-drug resistant wound pathogen, *A.baumannii* and Mammalian Cell Biocompatibility in vitro / Cady N.C., Behnke J.L., Strickland A.D. // *Adv. Funct. Mater.*- 2011. – V. 21. – P. 2506-2514.
8. Wu J. In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing / Wu J., Zheng Y., Song W., Luan J., Wen X., Wu Z., Chen X., Wang Q., Guo S. // *Carbohydr Polym.* – 2014. – V.102. – P. 762-71.
9. Saska S. Bacterial Cellulose-Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone Regeneration / Saska S., Barud H., Gaspar A., Marchetto R., Ribeiro S., Messaddeq Y. // *Int. J. Biomat.* -2011. - V. 2011. - P. 1-8.
10. Ahn S. Characterization of hydroxyapatite-coated bacterial cellulose scaffold for bone tissue engineering / Ahn S., Shin Y., Kim S., Jeong S., Jeong J., Park J., Gwon H., Seo D., Nho Y., Kang S., Kim C., Huh J., Lim Y. // *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* – 2015. – V.20. – P. 948-955.
11. Pigossi S. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model / Pigossi S., de Oliveira G., Finoti L., Nepomuceno R., Spolidorio L., Rossa C., Ribeiro S., Saska S., Scarel-Caminaga R. // *J Biomed Mater Res A.* – 2015. – V.103. – P. 3397-406.
12. Буянов А.Л. Высокопрочные биосовместимые гидрогели на основе полиакриламида и целлюлозы: синтез, механические свойства и перспективы применения в качестве искусственных заменителей хрящевых тканей / Буянов А.Л., Гофман И.В., Хрипунов А.К., Ткаченко А.А., Ушакова Е.Э. // *Высокомолекулярные соединения. Серия А.* – 2013. – Т.55. – С. 512.
13. Мелихов И.В. Двумерно- кристаллический гидроксипатит / Мелихов И.В., Комаров В.Ф., Северин А.В., Божевольнов В.Е., Рудин В.Н // *ДАН.* – 2000. – Т.373. – С. 355-358.
14. McNally E. A model for the ultrastructure of bone based electron microscopy of ion-milled sections / McNally E., Schwarcz H., Botton G., Arsenault A. // *PLoS One.* – 2012. – V.7. – P.1-11.
15. Глимчер М. Молекулярная биология минерализованных тканей, в частности костной ткани. Современные проблемы биофизики / Глимчер М. // Т. II . М.: Иностран. лит. - 1961.- С. 94–127.
16. Suvorova E.I. Scanning and transmission electron microscopy for evaluation of order/disorder in bone structure / Suvorova E.I., Petrenko P.P., Buffat P.A. // *Scanning.* – 2007. – V. 29. – P.162-170.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. Arkharova N. SEM and TEM for structure and properties characterization of bacterial cellulose/hydroxyapatite composites / Arkharova N., Suvorova E., Severin A., Krashennnikov S., Khripunov A., Klechkovskaya V. // Scanning. -2016. - V.38. - P.757-565.
2. Романов Д.П. Нанотекстуры композитов, образующихся при взаимодействии гидроксиапатита и целлюлозы *Glucosacetobacter xylinus* / Романов Д.П., Хрипунов А.К., Баклагина Ю.Г., Северин А.В., Лукашева Н.В., Толмачев Д.А., Лаврентьев В.К., Ткаченко А.А., Архарова Н.А., Клечковская В.В. // Физика и химия стекла. – 2014. – Т. 40. - С.485-495.
3. Баклагина Ю.Г. Взаимодействие между наноразмерными кристаллическими компонентами композита на основе целлюлозы *Acetobacter Xylinum* и фосфатов кальция / Баклагина Ю.Г., Лукашева Н.В., Хрипунов А.К., Клечковская В.В., Архарова Н.А., Романов Д.П., Толмачев Д.А. // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2010. - Т. 52.- С.615-627.
4. Волков В.В. Определение размера и фазового состава наночастиц серебра в гель-пленке бактериальной целлюлозы методами малоуглового рентгеновского рассеяния, электронной дифракции и электронной микроскопии/ Волков В.В., Клечковская В.В., Штыкова Э.В., Дэмбо К.А., Архарова Н.А., Ивакин Г.И., Смыслов Р.Ю. // Кристаллография. – 2009. - Т.54. – С. 197-201.
5. Klechkovskaya V.V. Network model of *Acetobacter xylinum* Cellulose intercalated by drug nanoparticles / Klechkovskaya V.V., Volkov V.V., Shtykova E.V., Arkharova N.A., Baklagina Y.G., Khripunov A.K., Smyslov R.Yu., Borovikova L.N., Tkachenko A.A. // NATO security through Science Series C: Enviromental Security. -2008. - С. 165-177.

### Тезисы докладов

- 1.Архарова Н.А., Клечковская В.В., Суворова Е.И. Исследование композита на основе гель-пленки бактериальной целлюлозы с внедренными наночастицами селена // VI Национальная конференция по применению Рентгеновского, Синхротронного излучений, нейтронов и электронов для исследования наноматериалов и наносистем. Москва. 2007 г. Тезисы докладов. С.235.
- 2.Баклагина Ю.Г., Романов Д.П., Лаврентьев В.К., Хрипунов А.К., Смыслов Р.Ю., Архарова Н.А. Структура биокompозитов на основе целлюлозы *acetobacter Xylinum* и гидратированных фосфатов кальция//VI Национальная конференция по применению Рентгеновского, Синхротронного излучений, нейтронов и электронов для исследования наноматериалов и наносистем. Москва. 2007 г. Тезисы докладов. С.239.
- 3.Архарова Н.А., Клечковская В.В., Суворова Е.И. Образование нанопроволок селена на поверхности бактериальной целлюлозы // Ультрамелкозернистые и наноструктурные материалы. Уфа. 2008 г. Тезисы докладов. С.110.

- 4.Архарова Н.А., Ключковская В.В., Суворова Е.И., Изменение структуры наночастиц селена в матрице гель-пленки бактериальной целлюлозы в присутствии в реакционной системе серебра // III Международная конференция по коллоидной химии и физико-химической механике. Москва. 24-28 июня 2008 г. Программа и резюме докладов. С.72-73.
- 5.Arkharaova N., Klechkovskaya V., Suvorova E. TEM investigation of Se nanostructures in/on Acetobacter xylinum cellulose gel-film // 14<sup>th</sup> European Microscopy congress. Aachen, Germany. 1-5 September 2008 y. EMC 2008. V.2 Material Science. P.119-120
- 6.Akharova N.A., TEM investigation of composite based on hydrated calcium phosphate and gel film of cellulose acetobacter xylinum // Molecular order and mobility in Polymer Systems, 6<sup>th</sup> International symposium. St. Petersburg. June 2-6, 2008. Book of abstracts. P-221
- 7.Khripunov A.K., Baklagina Yu.G., Romanov D.P., Lukasheva N.V., Gofman I.V., Smyslov R.Yu., Tkachenko A.A., Nilova V.K., Arkharova N.A. Nano-composite based on cellulose acetobacter xylinum and calcium hydrophosphate – the precursor of the bone tissue// Molecular order and mobility in Polymer Systems, 6<sup>th</sup> International symposium. St. Petersburg. June 2-6, 2008.Book of abstracts. P-232.
- 8.Лукашова Н.В., Баклагина Ю.Г., Ключковская В.В., Романов Д.П., Хрипунов А.К., Архарова Н.А., Панарин Е.Ф. Комплексное исследование структуры композиционного материала (прекурсора костной ткани) на основе целлюлозы Acetobacter Xylinum и фосфатов кальция // VII Национальная конференция «Рентгеновское, синхротронное излучение, нейтроны и электроны для исследования наносистем и материалов. Нано-Био-Инфо-Когнитивные технологии» (РСНЭ-НБИК 2009). Москва. 16-21 ноября 2009 г. Тезисы докладов.С.39.
- 9.Khripunov A.K., Lukasheva N.V., Klechkovskaja V.V., Baklagina Ju.G., Arkharova N.A., Romanov D.P., Panarin E.F. Biocompatible nanocomposite materials developed from Acetobacter Xylinum cellulose and synthetic calcium phosphates for bone implants: experiment and computer modeling //Vth International symposium “Design and synthesis of supramolecular architectures”. October 12-16 2009. Kazan (Russia). Abstracts.P.69
- 10.Архарова Н.А., Ключковская В.В. Морфология и структура композита на основе целлюлозы Acetobacter Xylinum и фосфатов кальция // XVI Российский симпозиум по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел. Черногловка. 31 мая-3 июня 2009 г. Тезисы докладов. С.191.
- 11.Arkharaova N.A., Severin A.V., Baklagina U.G., Khripunov A.K. Electron microscopy andX-Ray analysis of nanocomposites bacterial cellulose/hydroxyapatite // 8<sup>th</sup> International symposium Molecular Order and Mobility in Polymer Systems. St. Petersburg. June 2-6 2014. Book of abstracts. O-50.
- 12.Архарова Н.А., Орехов А.С., Ключковская В.В., Хрипунов А.К., Баклагина Ю.Г. Особенности взаимодействия нанокристаллов гидроксиапатита и наноразмерных лент бактериальной целлюлозы Gluconacetobacter xylinus //

XXV Российская конференция по электронной микроскопии. Черногловка. 2014. Тезисы докладов. Т.1. С. 172-173.

13. Архарова Н. А., Северин А. В., Клечковская В.В., Хрипунов А.К. Структура биокompозитов на основе гель-пленки бактериальной целлюлозы *Glucosacetobacter xylinus* и нанокристаллов гидроксиапатита как перспективных заменителей костной ткани // VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: Состояние и перспективы развития», Москва. 17-20 марта 2015 г. Материалы конгресса. Ч.1.С. 193-194.

14. Архарова Н.А., Северин А.В., Клечковская В.В. Биокompозиты на основе гель-пленки бактериальной целлюлозы *Glucosacetobacter xylinus* и нанокристаллов гидроксиапатита: структура и свойства // Вторая всероссийская молодежная научно-техническая конференция с международным участием «Инновации в материаловедении». Москва. 2015. Сб. материалов. С. 121.

15. Arkharova N. A., Severin A. V., Khripunov A. K., Orekhov A.S., Klechkovskaya V. V. TEM characterization of hydroxyapatite nanocrystals grown on the bacterial cellulose fibrils // 29 European Crystallographic Meeting. Croatia. 23-28 August 2015. Acta Cryst. (2015). A71. S 379.

16. Орехов А.С., Архарова Н.А., Клечковская В.В., Буянов А.Л., Хрипунов А.К., Смыслов Р.Л. Структура биокompозитов на основе бактериальной целлюлозы *Acetobacter xylinus* и полиакриламида как перспективных заменителей хрящевых тканей // XIX Российский симпозиум по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел (РЭМ-2015). Черногловка. 1-4 июня 2015 г. Сб. тезисов. С.336-337.

17. Архарова Н.А., Романов Д.П., Клечковская В.В., Хрипунов А.К., Баклагина Ю.Г. Взаимодействие нанокристаллов гидроксиапатита с лентами бактериальной целлюлозы // Симпозиум «Химия для биологии, медицины, экологии и сельского хозяйства». Санкт-Петербург. 24-26 ноября 2015 г. Сб. тезисов. С. 230

18. Архарова Н.А., Северин А.В., Хрипунов А.К., Клечковская В.В. Бактериальная целлюлоза как основа композитных материалов для костной инженерии // 20-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология- наука XXI века». Пущино. 18-22 апреля 2016 г. Сборник тезисов. С.212-213.

19. Архарова Н.А., Северин А.В., Суворова Е.И., Хрипунов А.К., Клечковская В.В. Морфология, структура и свойства композитов на основе бактериальной целлюлозы *Glucosacetobacter xylinus* и нанокристаллов гидроксиапатита // XXVI Российская конференция по электронной микроскопии. Зеленоград. 2016. Тезисы докладов. С. 42.

20. Архарова Н.А., Суворова Е.И., Северин А.В., Хрипунов А.К., Клечковская В.В. Электронная микроскопия в исследовании композитов на основе бактериальной целлюлозы *Glucosacetobacter xylinus* // Первая российская конференция: «Физика – наукам о жизни». Санкт-Петербург. 12-16 сентября 2016 г. Тезисы докладов. Вт.-2.38с.

21. Архарова Н.А., Северин А.В., Хрипунов А.К., Клечковская В.В. Структура и свойства композитных пленок на основе целлюлозы *Glucosacetobacter xylinus* и

нанокристаллов гидроксиапатита //VII Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры-2017». Москва.13-17 июня 2017. Сборник тезисов. С.602.

22.Arkharova N.A., Klechkovskaya V.V., Severin A.V., Khripunov A.K. Influence of bacterial cellulose fibers on structure and properties of hydroxyapatite powder // 9-th International Symposium Molecular Order and Mobility in Polymer Systems. St. Petersburg. June 19-23 2017. Book of abstracts. O-65.