

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 *Glucosacetobacter 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

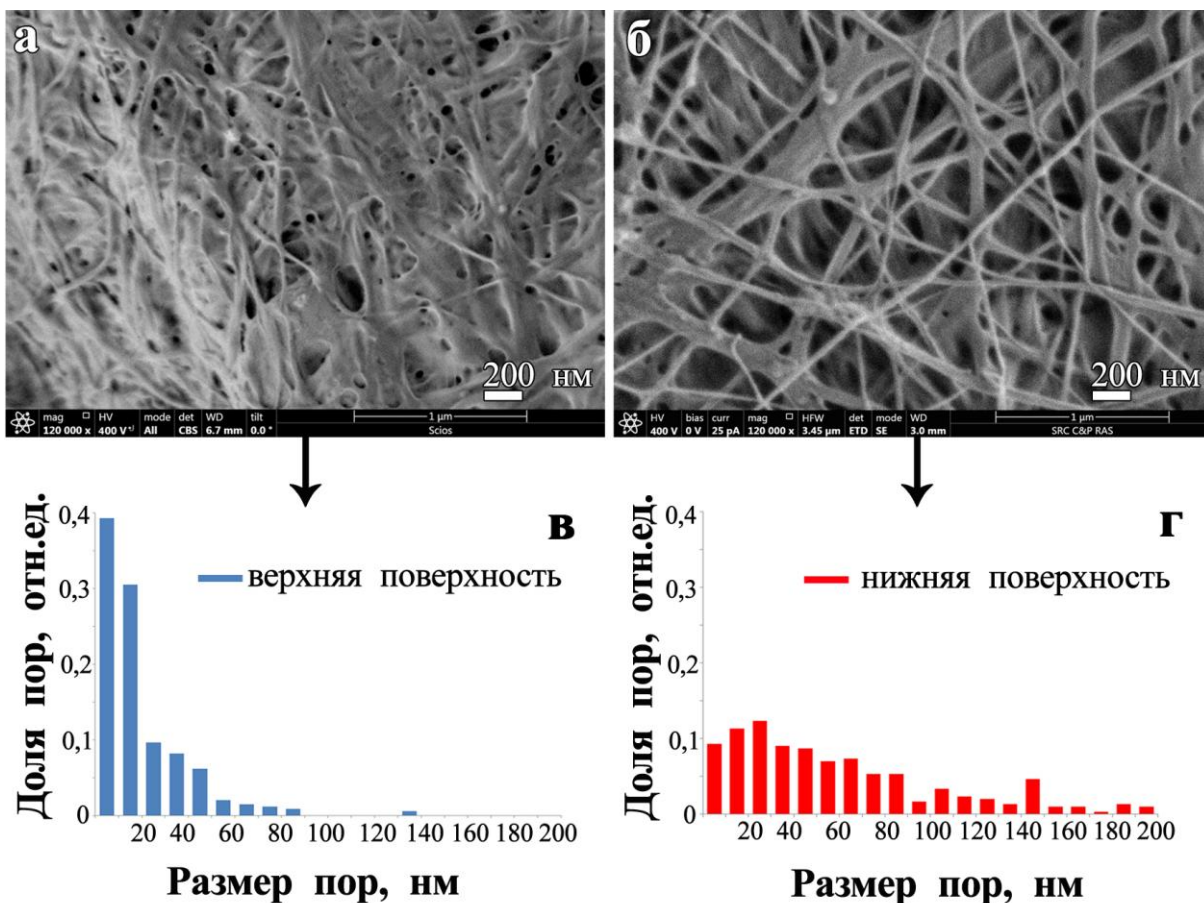
компонентов. Такой подход обусловлен поиском материала, наиболее приближенного по структуре и свойствам к естественной костной ткани.

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.

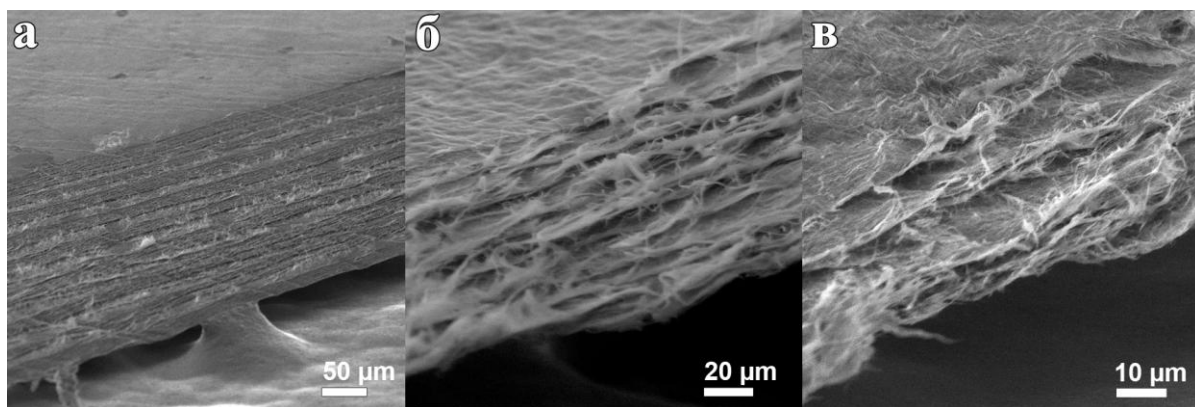


СЭМ-изображения поверхностей nano-гель-пленки ЦГХ приведены на Рис.1. На верхней поверхности nano-гель-пленки ЦГХ формируются поры диаметром от нескольких единиц нанометров до ста нанометров, при этом основная доля пор имеет размер до 20 нм. Нижняя поверхность гель-пленки представляет собой «губку» из 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 nano-гель-пленки ЦГХ. Гистограммы распределения пор по размерам на верхней (в) и нижней (г) поверхностях nano-гель-пленки ЦГХ.

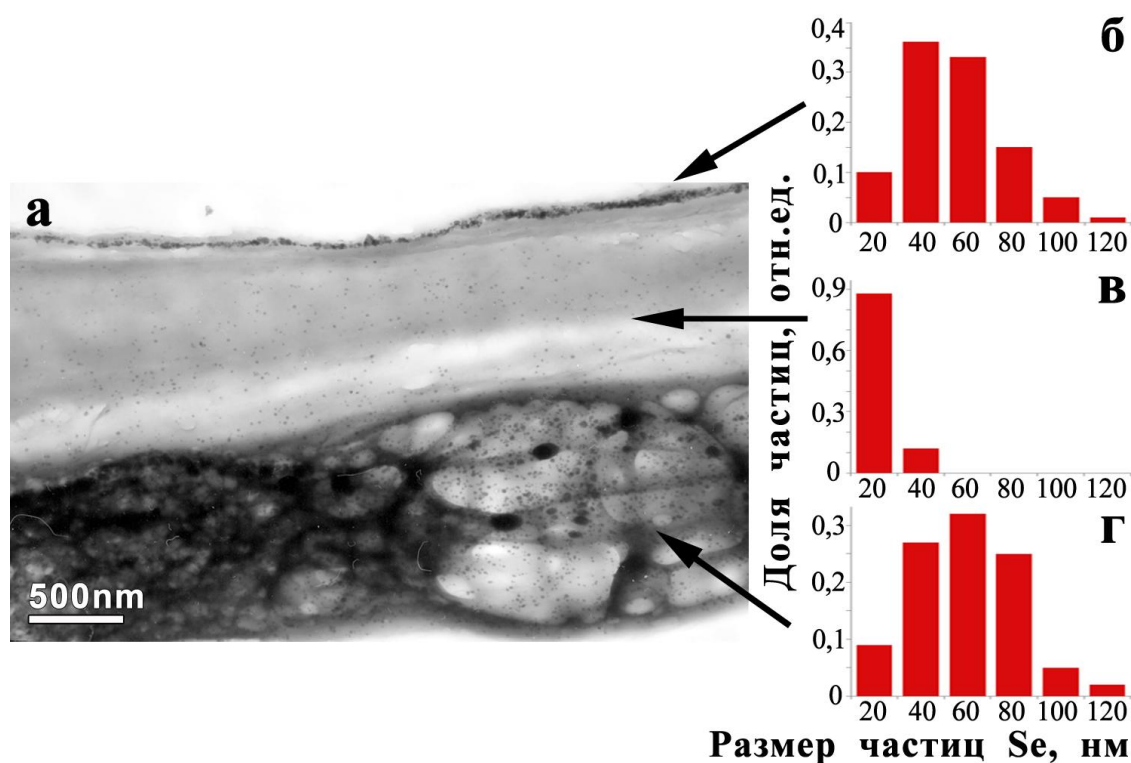
Дезинтегрирование nano-гель- пленки в лабораторном блендере приводит к образованию фрагментов микрофибрилл и лент ЦГХ в водном растворе со средним размером 500 мкм (для скорости вращения 2 000 об./мин) и 300 мкм (для скорости вращения 15 000 об./мин). Анализ полученных изображений nano-гель-пленки ЦГХ 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.

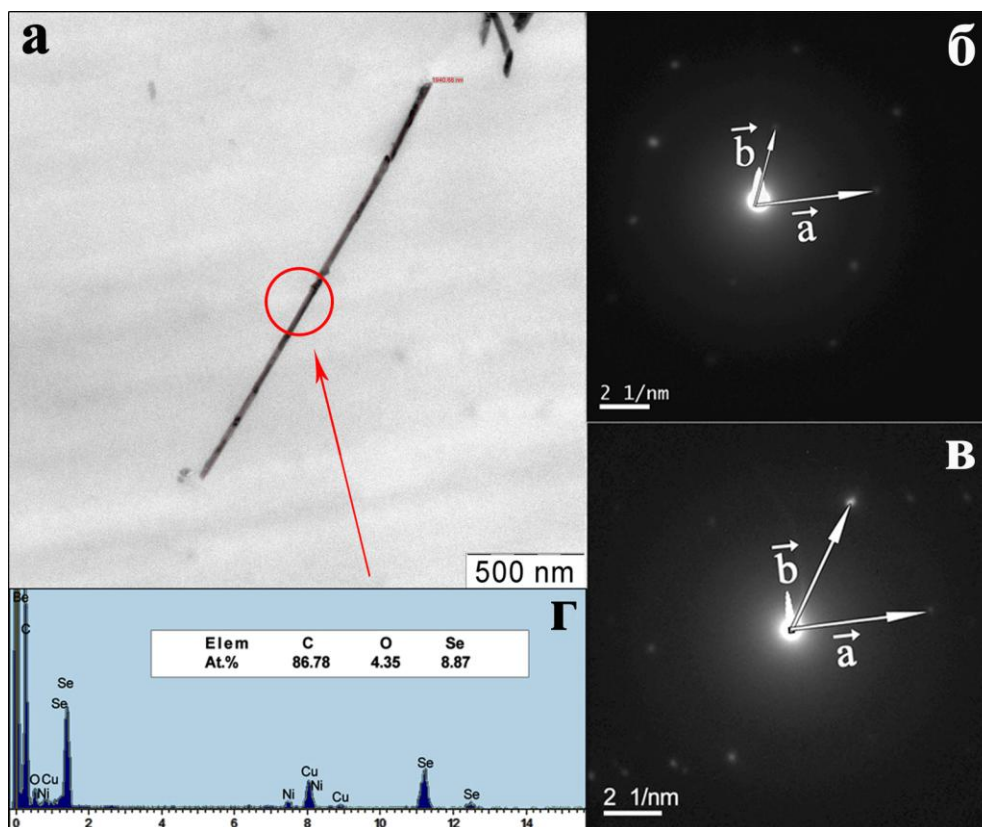
ПЭМ-изображение тонкого среза нано-гель-пленки ЦГХ с сорбированными наночастицами Se приведено на Рис.3.



**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 пленки 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).

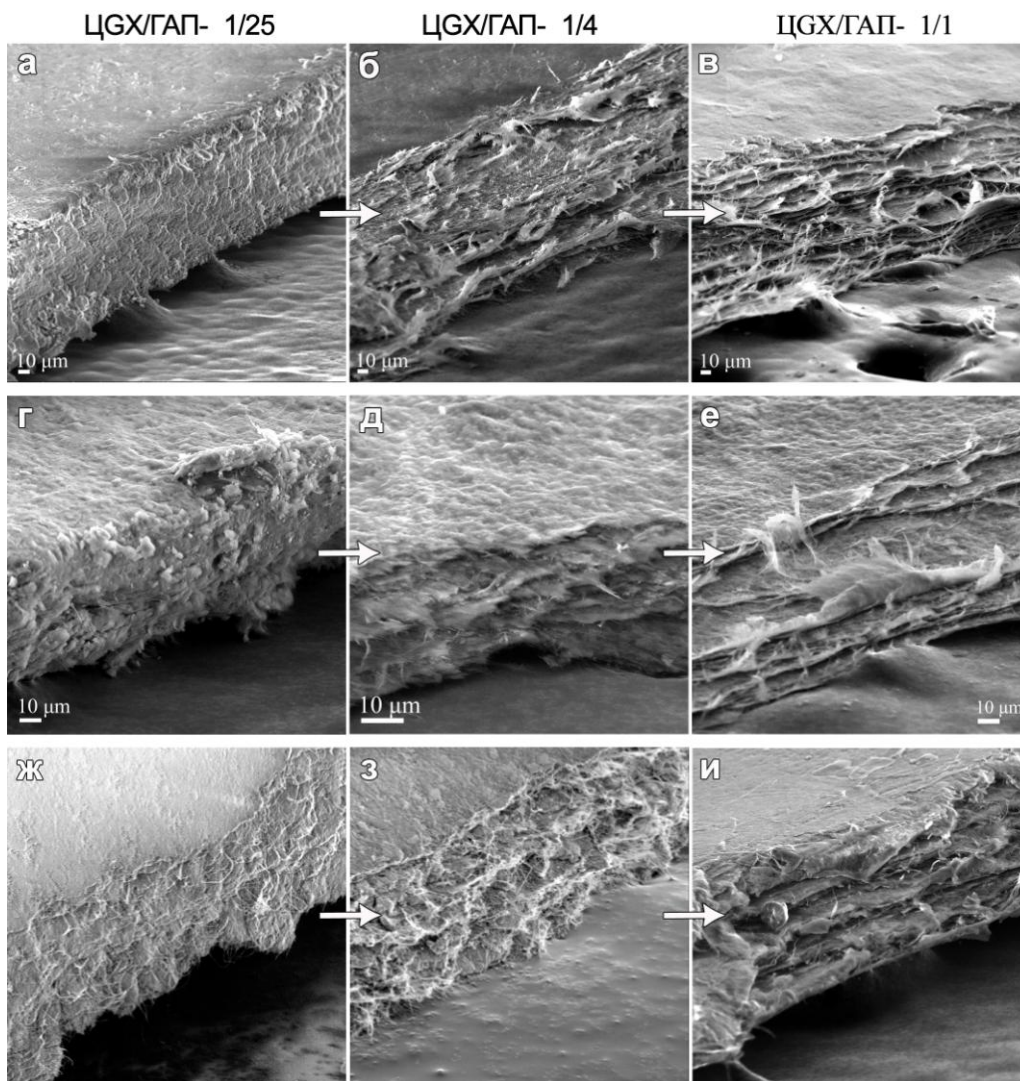


**Рис.4.** ПЭМ-изображение нанопроволоки селена (а) и картины электронной дифракции от неё, полученные при вращении образца на угол  $0.6^\circ$  (б),  $10.6^\circ$  (в). ЭДС-спектр от нанопроволоки (г).

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  $a=b=4,36\text{\AA}$ ,  $c=4,95\text{\AA}$ ,  $\gamma=120^\circ$ . 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.

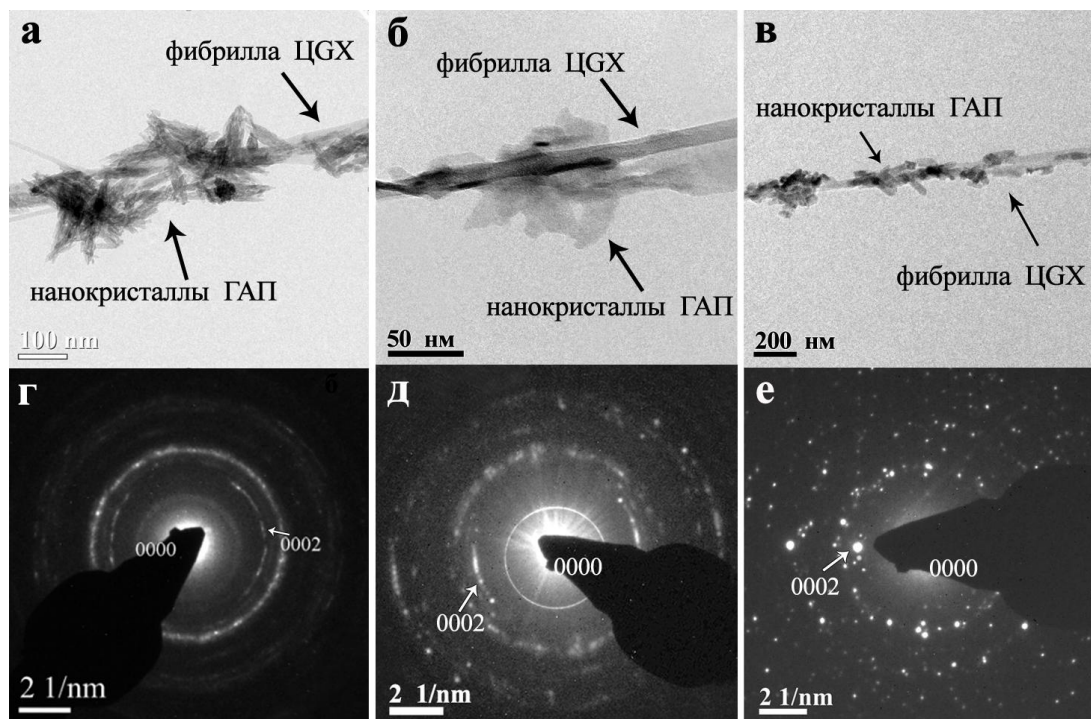
В пятой главе приведены результаты исследования структуры и свойств композитов на основе матрицы-полимера ЦГХ и нанокристаллов ГАП, полученных тремя способами с варьированием соотношений компонентов: 1) механическим смешиванием водных суспензий ЦГХ и ГАП; 2) путем синтеза нанокристаллов ГАП в водной 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 агрегаты. Однако абсолютно гомогенной структуры не наблюдается: агрегаты 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].

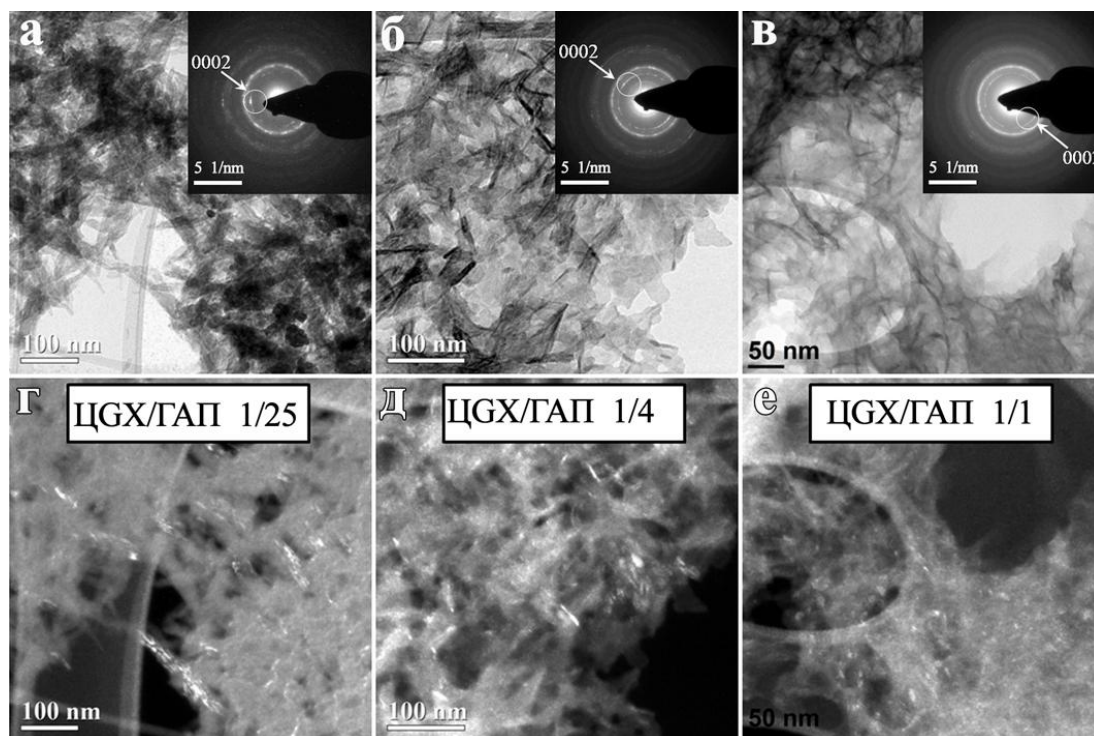


*Рис.5. СЭМ-изображения боковых сколов пленок ЦГХ/ГАП и их внутренней структуры при увеличении массовой доли бактериальной целлюлозы в композитах, полученных механическим смешиванием суспензий ЦГХ и ГАП (а, б, в), путем синтеза нанокристаллов ГАП в водной среде с добавлением суспензии ЦГХ (г,д,е), путем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

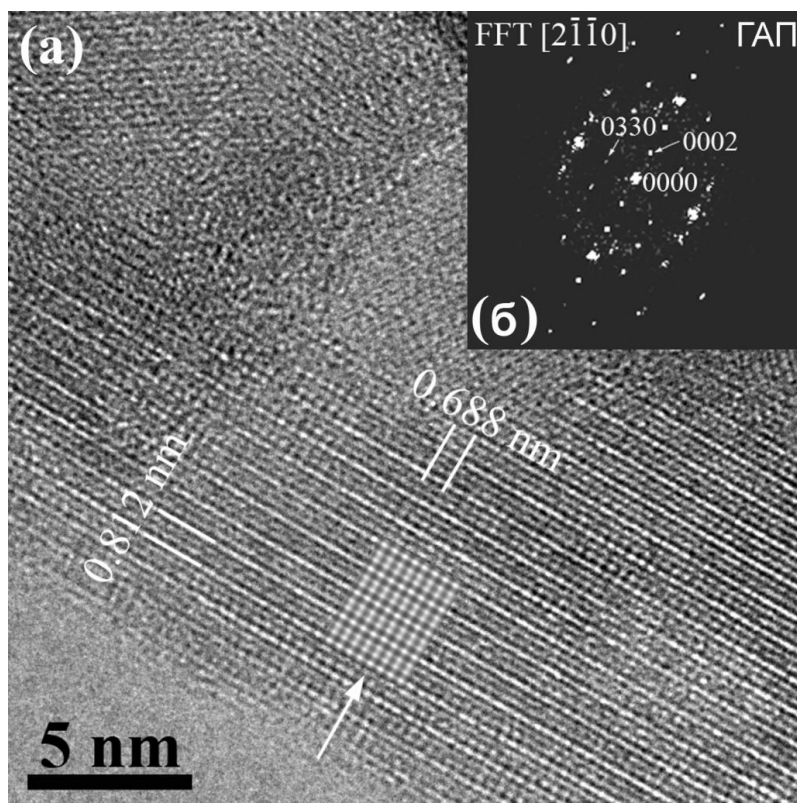


**Рис.7.** ПЭМ-изображения композитов ЦГХ/ГАП, полученных путем синтеза ГАП в водной среде с добавлением суспензии ЦГХ с соотношениями компонентов: 1/25 (а), 1/4 (б), 1/1 (в) и соответствующие темнопольные изображения (г, д, е), полученные в рефлексе 0002.

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.

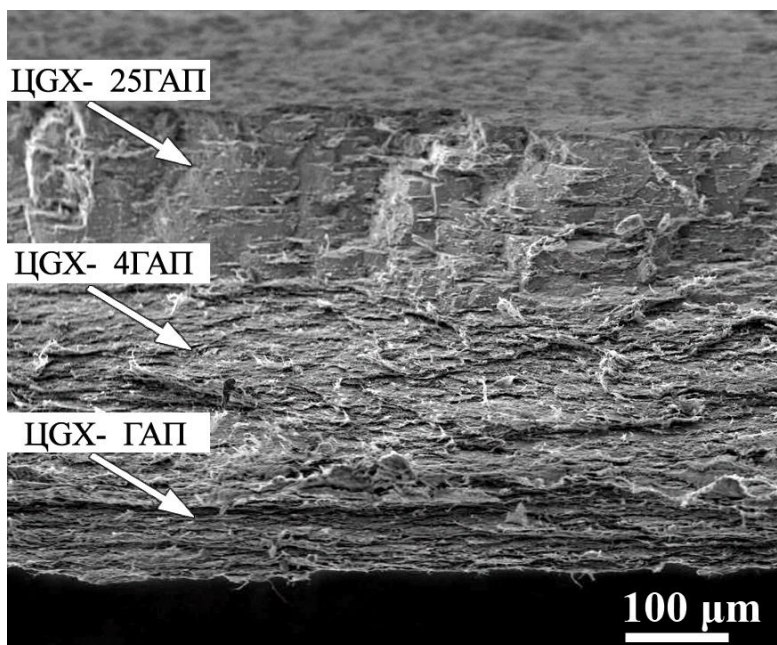
После сравнения экспериментального изображения с моделированными, рассчитанными для оси зоны  $[2-1-10]$ , учитывали возможный наклон образца относительно точной оси зоны, а также параметры вибрации по осям  $x$  и  $y$ . Наилучшее соответствие было найдено для расчетных изображений при значении толщины  $4.05 - 4.86$  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 заполнения 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. Опубл. 20.09.2002.
4. Афиногенов Г.Е. Водорастворимая серебросодержащая 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.: Иностр. 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. Arkharova 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 // V<sup>th</sup> 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. Черноголовка. 31 мая-3 июня 2009 г. Тезисы докладов. С.191.
11. Arkharova N.A., Severin A.V., Baklagina U.G., Khripunov A.K. Electron microscopy and X-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 *Glucanacetobacter 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 *Glucanacetobacter 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 *Glucanacetobacter 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 *Glucanacetobacter 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 *Glucanacetobacter 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.