На правах рукописи

МАКАРОВА АНАСТАСИЯ ОЛЕГОВНА

СТРУКТУРА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛОК-ПОЛИСАХАРИДНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ, АРМИРОВАННЫХ УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ

1.5.2 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2022

Работа выполнена в лаборатории биофизической химии наносистем Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН).

Научный руководитель:	**Зуев Юрий Федорович** доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией биофизической химии наносистем КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань
Официальные оппоненты:	**Холявка Марина Геннадьевна** доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры биофизики и биотехнологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», г. Воронеж; **Селиванова Наталья Михайловна** доктор химических наук, доцент, профессор кафедры физической и коллоидной химии ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань
Ведущая организация:	Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», г. Саратов

Защита состоится **«29» сентября 2022 г.** в **11:00** часов на заседании диссертационного совета 24.1.225.02 на базе ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д.2/31.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ФИЦ КазНЦ РАН и на официальном сайте КИББ ФИЦ КазНЦ РАН http://www.kibb.knc.ru.

Автореферат разослан «__»_____ 2022 г.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я 261, КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, учёному секретарю диссертационного совета (e-mail: dissovet@kibb.knc.ru).

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук — Пономарева Анастасия Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Поступательное развитие науки в РФ в современных условиях требует углубления фундаментальных знаний в тесном сочетании с их практическим применением. Современные тенденции физико-химической биологии и поиск новых решений задач биотехнологии и медицины требует более детальной информации о структуре таких биополимеров, как белки и полисахариды, и их комплексов.

Помимо своих индивидуальных биохимических функций в живых системах белки и полисахариды участвуют в формировании супрамолекулярных структур, которые несут специфическую структурно-функциональную нагрузку. Среди этих ключевых функций – формирование каркасных структур (*scaffolds*), обеспечивающих пространственную целостность и функциональность живых систем, барьеров, отделяющих отдельные компартменты в живых организмах и служащих «шлюзами» для транспорта продуктов жизнедеятельности. Взаимодействие белков и полисахаридов между собой в водной среде живых систем формирует уникальную пространственную среду, структурные и физико-химические свойства которой определяют условия функционирования организмов на уровне внеклеточных и межклеточных компартментов. Одним из характерных представителей таких структур являются трехмерная сетка гидрофильных биополимеров, способная удерживать в своем объеме большое количество воды или физиологической жидкости, получившие название «гидрогели» (Chander *et al.,* 2021).

Фундаментальные исследования межмолекулярных взаимодействий биологических макромолекул и формирования на их основе функциональных супрамолекулярных комплексов являются неотъемлемой частью современной физико-химической биологии и ее составной части – молекулярной биофизики.

Помимо своей функциональной роли в живых системах, в последние десятилетия гидрогели находят все более широкое прикладное применение. Они представляют собой многообещающую платформу для широкого спектра агротехнических и биомедицинских применений благодаря своей биосовместимости, превосходной проницаемости для питательных веществ, метаболитов и сходству структуры и свойств с нативным внеклеточным матриксом (Patra *et al.,* 2018; Baranwal *et al.,* 2022).

Более распространенными в природе и технологичными являются «физические» гидрогели, в которых трехмерная полимерная сеть существует благодаря механическому переплетению макромолекул и/или их стабилизации за счет межмолекулярных взаимодействий, включая ионные мостики, водородные связи и гидрофобные силы (Eslahi *et al.,* 2016; Almawash *et al.,* 2022).

По многообразию регулируемых свойств большие перспективы имеют композиционные системы на основе белков и полисахаридов. Благодаря своим уникальным структурным свойствам, включающим перестраиваемые физические, химические, биологические характеристики, и хорошей биосовместимости белок-полисахаридные гидрогели являются перспективными материалами в медицине и фармакологии (Parisiet *et al.,* 2016). В последнее время гидрогели все чаще используют в качестве носителей лекарственных средств и как заменители тканей в регенеративной медицине (Wang *et. al.,* 2007; Slaughter *et. al.,* 2009). Однако, как и в фундаментальной физико-химической биологии, в биотехнологии большое значение имеет четкая качественная и количественная информация о структуре и других биофизических характеристиках биологических макромолекул и супрамолекулярных систем на основе.

Одним из классических биофизических приемов при изучении структуры биополимеров и их комплексов является использование «возмущающих» факторов, таких как изменение температуры, ионной силы среды или влияние модифицирующих добавок. В

данной работе в качестве такого фактора были выбраны углеродные нанотрубки (УНТ). Благодаря своей структурной гибкости, уникальным механическим, электрическим, тепловым и другим свойствам УНТ могут существенно изменять характеристики белок-полисахаридных гидрогелей (Zhang *et al.,* 2009). При этом, необходимо иметь в виду, что использование любых наноматериалов, в том числе и УНТ, может иметь потенциально опасный биологический характер из-за способности УНТ воздействовать на субклеточные и клеточные структуры, а также в целом на органы и ткани живых организмов (Hurt *et al.,* 2006).

Исследования, поиск и установление взаимосвязей между составом белок-полисахаридных систем, их индивидуальной молекулярной структурой, супрамолекулярной структурой и физико-химическими свойствами комплексов белков и полисахаридов, а также определение влияния модифицирующих добавок на перечисленные факторы является важной научной задачей в области структурной биологии и биофизики. Несмотря на наличие достаточно большого количества данных по межмолекулярному взаимодействию, структуре белок-полисахаридных систем, свойствам их композиционных гидрогелей и влиянию УНТ на характеристики и цитотоксические эффекты в живых и биоинженерных системах, в этой области существуют не исследованные проблемы и вопросы, которые успешно могут решаться комплексом биофизических подходов и методов.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось изучение влияния многостенных углеродных нанотрубок на структуру, физико-химические и солюбилизационные свойства белок-полисахаридных гидрогелей.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи:**

1. С использованием современных рентгеноструктурных и микроскопических методов изучить структурные особенности и трансформацию белок-полисахаридных гидрогелей в присутствии углеродных нанотрубок.
2. С применением комплекса физико-химических методов охарактеризовать механические и электропроводящие свойства белок-полисахаридных систем в присутствии углеродных нанотрубок.
3. Количественно изучить свойства сконструированных белок-полисахаридных гидрогелей по связыванию и высвобождению биологически-активных и вспомогательных препаратов на примере ряда ферментов, витаминов и диагностических красителей.
4. По данным триптофановой флуоресценции исследовать стабильность нативной структуры белков, иммобилизованных в гидрогеле.
5. Охарактеризовать биосовместимость (цитотоксичность) сконструированных гидрогелей в отношении линий опухолевых клеток: HeLa (клетки рака шейки матки человека) и A549 (аденокарциномы легких человека).

Научная новизна работы. Новизна работы включает в себя комплексную характеристику структуры и физико-химических свойств полисахаридных гидрогелей с включенными УНТ при контроле цитотоксичности этих систем. Для этого в работе использован комплекс взаимодополняющих методов – рентгеноструктурный анализ, сканирующая электронная и атомно-силовая микроскопия, кондуктометрия и реологические измерения. Впервые на основе полученных экспериментальных данных по рентгеновскому рассеянию и в рамках известных структурных моделей проведена численная оценка трехмерной супрамолекулярной структуры белок-полисахаридных комплексов, в том числе ее изменений в присутствии УНТ. Получены новые экспериментальные данные по пространственной организации, электропроводящим, вязкоупругим и механическим свойствам композиционных гидрогелей сложного состава. Разработанные системы были лабораторно испытаны в качестве моделей для инкапсуляции фармакологических и

диагностических препаратов. Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных, качественным и количественным сравнением с результатами независимых исследований других авторов.

Научно-практическая значимость работы. Полученные в работе результаты имеют большое научно-практическое значение в связи со все более широким использованием гидрогелей и других белок-полисахаридных композиционных систем в современных технологиях. Данные по регуляции структурных и физико-химических свойств белок-полисахаридных гидрогелей в присутствии углеродных нанотрубок имеет большое значение для разработки и применения композитных систем при создании лечебных материалов для использования в биомедицинских целях – в регенеративной медицине, фармакологии и т.д. Проведены успешные цитотоксические исследования гидрогелевых систем. Данные по оценке инкапсулирующей способности могут быть использованы при разработке технологий получения лекарственных форм пролонгированного действия.

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в учреждениях биологической, биотехнологической и физико-химической направленности, занимающихся исследованиями взаимосвязи структуры и свойств биополимеров и их композиций, изучением регуляции их свойств путем введения нанодобавок в биополимерную матрицу. Представленные материалы могут быть использованы в учебном процессе при чтении курсов лекций по биофизике.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Исследования проводились в соответствии с планом научных исследований КИББ ФИЦ КазНЦ РАН по теме «Биомакромолекулы и биорегуляторы: биосинтез, структура, механизмы внутриклеточной сигнализации и межклеточных взаимодействий. Биоконверсия и создание инновационных продуктов на основе биополимеров из растительного сырья» (номер госрегистрации № АААА-А18-118022790083-9). Работа частично поддержана грантами РФФИ № 18-415-160011 и № 19-38-90085. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты экспериментальных исследований по влиянию многостенных углеродных нанотрубок на структуру белок-полисахаридных гидрогелей и корреляция между морфологией гидрогелей и их физико-химическими и механическими свойствами, а также солюбилизационной емкости по отношению к ряду ферментов, витаминов и диагностических красителей.
2. В гидрогеле к-каррагинан-желатин супрамолекулярная структура формируется даже при высокой температуре в состоянии золя, сохраняясь при понижении температуре и переходе в гелеобразном состоянии.
3. Углеродные нанотрубки принципиально не меняют существующую супрамолекулярную структуру гидрогеля к-каррагинан-желатин, однако модулируют его механические, электропроводящие свойства, связывание и высвобождение биологически-активных и вспомогательных препаратов.
4. Тесты на биосовместимость разработанных гидрогелевых композиций показали их умеренную цитотоксичность в отношении линий опухолевых клеток: HeLa (клетки рака шейки матки человека) и A549 (аденокарциномы легких человека).

Апробация работы. Основные результаты проведенных исследований были представлены на: Молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ» (Москва, 2018, 2021); Международной конференции «Kazan Precision Medicine» (Казань, 2018); III

Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Казань, 2018); Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Дагомыс, 2019, 2021); Международной школы-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (Казань, 2019, 2021); XV Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (Севастополь, 2020); IV Всероссийская с международным участием школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века (Казань, 2021); Международная юбилейная конференция, посвященная 100-летию основания кафедры микробиологии в Казанском университете (Казань, 2021).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 25 работах, из них 6 статей в базах *Wed of Science* и *Scopus* и 1 статья в рецензируемом научном журнале, рекомендованном ВАК; 18 тезисов докладов в аналитической системе РИНЦ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 151 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 235 источников, из них 220 зарубежных. В работе представлено 6 таблиц и 62 рисунка.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Материалы. В работе использовали желатин типа А, к–каррагинан I типа и альгинат натрия производства «Sigma» США, многостенные углеродные нанотрубки «Таунит» производства ООО «НаноТехЦентр» (Тамбов, http://www.nanotc.ru) со средним диаметром 20-40 нм и с длиной, не превышающей 1 мкм; водорастворимые витамины группы B_2 и B_9; ферменты липаза *Candida* rugose, КФ 3.1.1.3 («Sigma», США) и биназа *Bacillus* pumilus, КФ 3.1.27.3 (кафедра Микробиологии, КФУ); красители: катионный бриллиантовый зеленый (БЗ) - оксалат тетраэтил-4,4-диаминотрифенилметана (ЗАО «Ярославская фармацевтическая фабрика»); анионный метиловый оранжевый (МО) - 4-(4-диме-тиламинофенилазо)бензолсульфонат натрия производства Шосткинского завода химреактивов, нейтральный флуоресцеина изотиоцианат (ФИТЦ), производства «Sigma». Все измерения проводили в ультрачистой воде, очищенной с помощью системы очистки воды «Arium Mini» («Sartorius», Германия).

1.2. Турбидиметрическое титрование. Турбидиметрические измерения желатины водными растворами к-каррагинана и альгината натрия проводились на спектрофотометре «Lambda 25» («Perkin Elmer», США) с термостатируемым кюветным отделением. Во время проведения измерений температура (T=23°C) оставалась неизменной. Эксперимент проводился в видимой области спектра при длине волны λ=400 нм.

1.3. Порошковая рентгеновская дифрактометрия. Исследование порошковой рентгеновской дифрактометрии проведены на дифрактометре «D8 Advance» («Bruker», Германия), оснащенном приставкой «Vario» и линейным координатным детектором «Vantec». Использовано Cu-$K_{\alpha 1}$ излучение (λ = 1.54063 Å) с изогнутым монохроматором Йохансона. Эксперименты выполнены при комнатной температуре в геометрии Брэгг-Брентано с плоским образцом. Обработка полученных данных выполнена с использованием пакета программ «EVA». Для идентификации кристаллических фаз была использована база «PDF-2».

1.4. Малоугловое рентгеновское рассеивание. Эксперименты по малоугловому рентгеновскому рассеиванию проводились на дифрактометре «Nanostar» («Bruker»,

Германия) излучение Cu–K_α, λ = 1.5418 Å, режим работы рентгеновской трубки 40 кВ, 35 мА, оборудованном двумерным CCD–детектором HiStar, при температуре 14, 23 и 35°С с образцами «на просвет» (в капиллярах диаметром 2 мм). Интегрирование двумерных картин рассеяния выполнялось с помощью пакета программ «SAXS», расчеты структурных параметров, моделирование и графическое представление результатов выполнены с использованием пакетов программ «SASView» и «PRIMUS».

1.5 Сканирующая электронная микроскопия. Эксперименты по сканирующей электронной микроскопии проводились на сканирующих электронных микроскопах «Merlin» («Carl Zeiss», Германия) в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия» (Казанский федеральный университет, Казань) и на «AURIGA CrossBeam» («Carl Zeiss», Германия) в Центре микроскопии ЦКП Казанского национальном исследовательском техническом университете им. А.Н. Туполева КАИ.

1.6 Атомно-силовая микроскопия. Использовался атомно-силовой микроскоп «Titanium» («NT–MDT», Россия). Эксперименты проводились в воздушной среде в полуконтактном режиме. Использовались стандартные кремниевые кантилеверы «NSG–10» («NT–MDT», Россия) с силовой константой 3.1-37.6 $Н·м^{-1}$ и резонансной частотой 140–390 кГц («NT–MDT», Russia). Все изображения были получены при комнатной температуре.

1.7. Реология. Измерения проводились на реометре «Physica MCR102» («Anton Paar», Австрия) с использованием измерительной системой «плита-плита» (50 мм) при температурах 14°С и 35°С. Температурный контроль образца осуществлялся с помощью нижней системы нагрева на элементах Пельтье P-PTD200 и активного кожуха на элементах Пельтье H-PTD200.

1.8. Кондуктометрия. В работе использован кондуктометр «InoLab Cond 7310 SET1» (Венгрия), предназначенный для определения электропроводности жидкостей. Эксперименты проводили при охлаждении образца в температурном интервале 50-10°С. Скорость охлаждения образцов составляла $0.012°С·с^{-1}$.

1.9. Методика определения высвобождения биологически-активных соединений из гидрогелевой матрицы. Измерения проводили на спектрофотометре «Lambda 25» («Perkin Elmer», США) с термостатируемым кюветным отделением. Концентрацию вышедшего зонда определяли при Т=23°С по поглощению: для бриллиантового зеленого (БЗ) λ=623 нм, метилового оранжевого (МО) λ=463 нм, флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ) λ=488 нм, липазы λ= 280 нм, биназы λ= 280 нм, фолиевая кислоты (витамин B_9) λ= 349 нм и рибофлавина (витамин B_2) λ=446 нм.

1.10. Флуоресцентная спектроскопия. Для регистрации спектров флуоресценции триптофановых остатков липазы и биназы использовали спектрофлуориметр «Флюорат-02-Панорама» («ЛЮМЕКС», Россия). Регистрацию проводили в диапазоне λ=310- 400 нм (через 1 нм) при длине волны возбуждения λ=295 нм. Перед измерением образцы в кварцевых кюветах и термостатировали при температуре 25°С в течение 10 минут.

1.11. МТТ-тест. Для оценки цитотоксичности полученных нанобиокомпозитов в качестве клеток-мишеней были использованы клетки опухолевых линий рака шейки матки человека HeLa («Biolot», Россия) и клетки аденокарциномы легких человека A549 из коллекции клеточных культур США (ACCC, CCL-185). Клетки засевали с плотностью 5–10 тыс./мл, выращивали до образования монослоя и заменяли среду на аналогичную, содержащую концентрации биназы до 300 мкг/мл. Спустя 24 ч культивирования клеток, в лунки вносили по 10 мкл МТТ («Sigma-Aldrich», США, 5 мг/мл) и 90 мкл полной среды и инкубировали в течение 2-3 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO_2. Измерение оптической

плотности осуществляли при λ=570 нм с помощью микропланшетного фотометра «Infinite 50» («Tecan», Австрия).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовались две основные белок-полисахаридные системы в зависимости от решаемых задач. Основные структурные задачи решались с использованием системы из желатина и к-каррагинана. Эта система всесторонне изучена на предмет супрамолекулярной структуры, морфологии, электропроводящих и реологических свойств. Она также использовалась во всех биохимических и цитотоксических тестах. Для решения ряда дополнительных задач более подходящей оказалась система на основе альгината натрия. На ней была отработана методика диспергирования УНТ с использованием раствора желатина, изучено влияния двухвалентных катионов на образование ячеистой структуры полисахаридов, а также, как и для первой системы, она использована для биохимических и цитотоксических тестов.

2.1. Определение условий образования полиэлектролитных комплексов в системе белок-полисахарид

Взаимодействие между противоположно заряженными полиэлектролитами в водной среде приводит к образованию полиэлектролитных комплексов (ПЭК) стехиометричного и нестехиометричного состава в зависимости от соотношения полиэлектролитов (Зезин и др., 1982).

Методом турбидиметрического титрования (рис. 1) определено массовое соотношение биополимеров ($Z=C_{полисах}/C_{белок}$) Z≈0.8 (к-каррагинан/желатин) и Z≈0.9 (альгината натрия/желатин), ниже которого в растворе стехиометричные ПЭК. При данных условиях в водной среде практически все молекулы белка и полисахарида участвуют в образовании белок-полисахаридных супрамолекулярных комплексов и в исследуемых системах не остается свободных молекул белка и полисахарида.

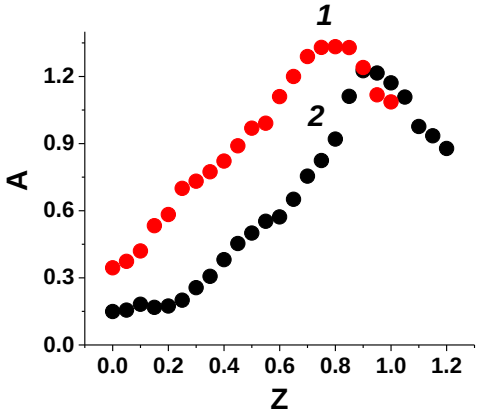


Рис. 1. Зависимость оптической плотности (A) от соотношения биополимеров (Z) по данным турбидиметрического титрования желатины водным раствором: 1 – к-каррагинана и 2 – альгинатом натрия при T = 23°C и λ = 400 нм.

Дальнейшие эксперименты проводились в области стехиометричных ПЭК постоянного состава. При данных условиях в водной среде практически все молекулы белка и полисахарида участвуют в образовании белок-полисахаридных супрамолекулярных комплексов и в исследуемых системах не остается свободных молекул белка и полисахарида. Дальнейшие эксперименты проводились в области стехиометричных ПЭК постоянного состава.

2.2. Структурный анализ к-каррагинан-желатиновых комплексов, в том числе модифицированных углеродными нанотрубками

2.2.1 Анализ фазового состояния белок-полисахаридных гидрогелей методом порошковой рентгеновской дифракции

Структура растворов желатина и к-каррагинана в индивидуальном виде и в составе композитного гидрогеля с добавлением УНТ изучалась с помощью порошковой рентгеновской дифракции в процессе естественного высыхания гелей на поверхности кремниевой пластинки.

Широкий пик на дифрактограмме желатина с максимумов в области 2θ = 20° определяется как «аморфное гало» и соответствует аморфной природе желатина (рис. 3.2А). На дифрактограмме к-каррагинана отчетливые пики (2θ = 15°-25°) указывают на значительную его кристалличность, а характерный пик 2θ = 20° соответствует аморфной слабоупорядоченной компоненте биополимера. В случае УНТ самый сильный дифракционный пик 2θ = 27° может быть определен как отражение (002) гексагональной структуры графита, а характерные пики в области углов дифракции 44°, 53° и 78° связаны с дифракцией от семейств плоскостей (100), (004) и (110).

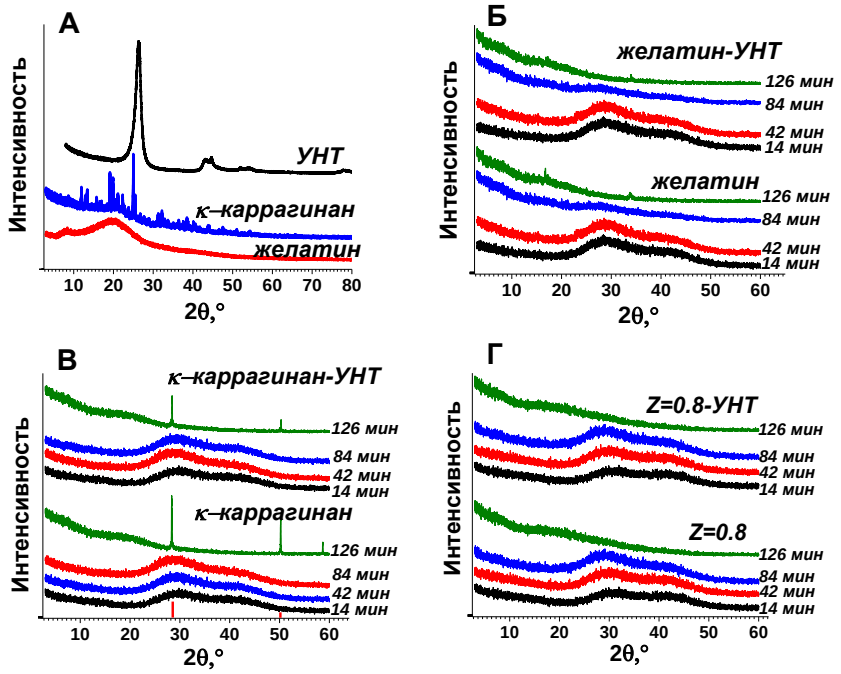


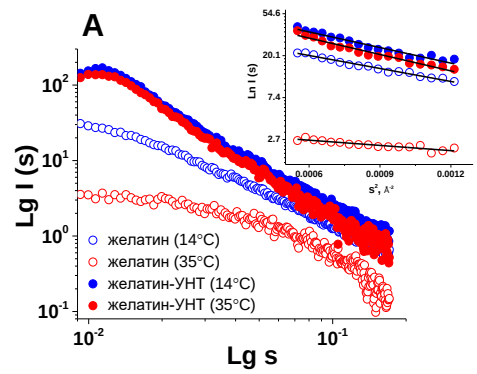
Рис. 2. Рентгеновские дифрактограммы: (А) исходных сухих компонентов гелей: желатин, к-каррагинан и УНТ; гелей на основе: (Б) желатин и желатин-УНТ; (В) к-каррагинан и к-каррагинан-УНТ; (Г) к-каррагинан-желатин (Z=0.8) и к-каррагинан-желатин-УНТ (Z=0.8-УНТ).

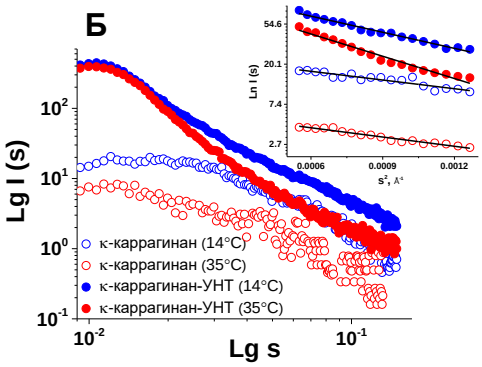
При объединении в образце одновременно полисахарида и белка фазовая структура образца меняется – не наблюдается кристаллизации ни одной из ранее присутствующих кристаллизующихся компонент (рис. 2Г). Это косвенно указывает на факт гомогенизации системы без выделения отдельных компонент в индивидуальные ассоциаты. Интеграция полисахарида и белка в композитный гидрогель приводит к образованию интегральной супрамолекулярной структуры, очевидно определяемой белок-полисахаридными полиэлектролитными комплексами. При этом добавление нанотрубок оказывает еще более стабилизирующий такое состояние эффект – сравнение дифрактограмм на рис. 2Г с экспериментом на сухих образцах (рис. 2А) указывает на гомогенизацию системы.

Фазовая однородность изученных систем, подтвержденная методом порошковой рентгеновской дифрактометрии, не исключает процессы агрегации и сегрегации в образцах на всех масштабных уровнях, что можно оценить с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния.

2.2.2. Структурная характеристика супрамолекулярной организации гидрогеля по данным малоуглового рентгеновского рассеивания

Методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) количественно охарактеризован надмолекулярный уровень организации гидрогеля и его трансформация, связанная с присутствием УНТ.





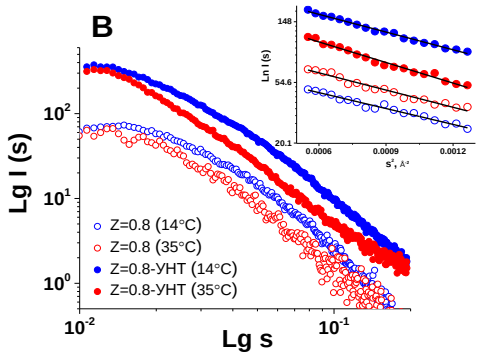


Рис. 3. Интенсивность МУРР в двойном логарифмическом масштабе с линейными участками графика Гинье (на вставках) для систем в состояниях геля (14ºС) и золя (35ºС): (А) желатин и желатин-УНТ; (Б) к-каррагинан и к-каррагинан-УНТ; (В) к-каррагинан-желатин (Z=0.8) и к-каррагинан-желатин-УНТ (Z=0.8-УНТ).

Для гидрогеля к-каррагинан-желатин характерно более интенсивное рассеяние (рис. 3В), чем в исходном желатине (рис. 3А) и к-каррагинане (рис. 3Б), что связано с участием обеих компонент в формировании объединенной супрамолекулярной структуры на основе ПЭК. Минимальные различия кривых МУРР для разных температур свидетельствуют о сохранении типа надмолекулярной структуры при изменении температуры изученных систем. В присутствие УНТ во всех исследуемых образцах наблюдается увеличение интенсивности рассеяния, что может быть связано с рассеянием от УНТ и увеличением размеров рассеивающих объектов. Незначительное изменение интенсивности МУРР с ростом температуры для системы к-каррагинан-желатин (рис. 3В), свидетельствует о неизменности типа надмолекулярной структуры при добавлении УНТ.

Для всех рассматриваемых систем характерно уменьшение радиуса инерции ПЭК R_g (рис. 4А) при переходе системы из состоянии золя (35ºС) в гель (14ºС), что указывает на компактизацию комплекса при понижении температуры. Присутствие УНТ увеличивает R_g, что свидетельствует об инициировании углеродными нанотрубками образования в образцах более крупных рассеивающих объектов в виде макромолекулярных клубков.

Дополнительно были выполнены расчеты функции распределения расстояний в частицах $P(r)$, что позволило оценить характеристичный максимальный размер частиц D_{max} и значение R_g (альтернативная оценка по всей экспериментальной кривой) (табл. 1). Полученные значения фрактальной размерности частиц d_f (табл. 1) (характеризующие гетерогенность их поверхности, а значит и степень укладки полимерных цепей), характерны для полимерных клубков, набухших в хорошем растворителе.

Таблица 1 – Структурные параметры гидрогелей: радиус инерции (R_g), средний радиус сферических частиц (R_{sph}), радиус поперечного сечения цилиндрических частиц (R_c), средний радиус цилиндрических частиц (r_c), длина цилиндрических частиц (L), максимальный размер частиц (D_{max}), фрактальная размерность частиц (d_f).

Образец	**T, °C**	***Анализ Гинье***					***P(r)***		d_f
		R_g, Å	R_{sph}, Å	R_c, Å	r_c, Å	L, Å	R_g, Å	D_{max}, Å	
желатин	14	47.5	61.3	–	–	–	42.5	149	1.19
	35	54.6	70.4	–	–	–	57	200	1.32
желатин-УНТ	14	86.4	111.4	–	–	–	113.9	351	1.89
	35	109.6	141.4	–	–	–	112.9	362	1.97
к-каррагинан	14	40.9	52.8	17	22	156	48	157.7	2.1
	35	67.3	86.8	14	18	159	56.2	190	1.61
к-каррагинан-УНТ	14	122	158	106	137	207	127.7	370	1.86
	35	130.8	139	69	89	289	129	385	1.93
желатин-к-каррагинан	14	56	72.3	21.2	27.4	179.5	63.4	222.7	1.7
	35	66.2	85.5	21.3	27.6	208.4	72.1	249	1.98
желатин-к-каррагинан-УНТ	14	73	94.2	28	36	233.5	77.4	241.3	2.05
	35	81	105	46	59	231	96.1	324	2.11

Сравнение полученных значений R_g и D_{max} позволило предположить, что форма рассеивающих частиц не сферическая (рис. 4А), а вытянутая (цилиндрическая) (рис. 4Б). Добавление УНТ не изменяет тип супрамолекулярной структуры геля, а лишь приводит к небольшому увеличению размера частиц (табл. 1).

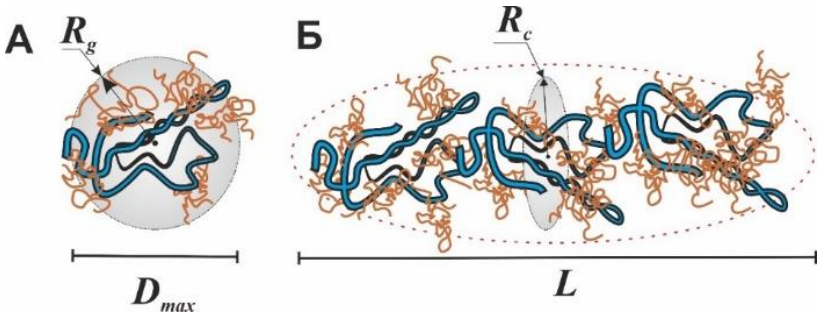


Рис. 4. Схематичное изображение (А) сферической и (Б) цилиндрической моделей частиц с размерными параметрами.

На основе этой информации было проведено моделирование экспериментальных данных МУРР с применением двух наиболее используемых моделей - цилиндрических частиц в гелях (Yuguchi *et al.*, 2002; McAulay *et al.*, 2020) и геля Гаусса-Лоренца (G-L) (Evmenenko *et al.*, 2001). Однако, в рамках модели цилиндрических частиц в геле не удалось добиться адекватного фитинга экспериментальных данных. Мы полагаем, что для гидрогеля к-каррагинан-желатина полученные экспериментальные данные корректнее описываются моделью геля Гаусса-Лоренца, имеющей ясный физический смысл для макрмолекулярных систем с сеткой физических взаимодействий и зацеплений. Нами установлено, что при модификации гидрогеля углеродными нанотрубками в пределах одной температуры изменение размеров сшивок (динамической корреляционной длины, ξ) незначительно. При этом заметно увеличивается длина статистической корреляции (средний размер ПЭК, Ξ), что свидетельствует об увеличении размеров молекулярных клубков в модифицированном геле.

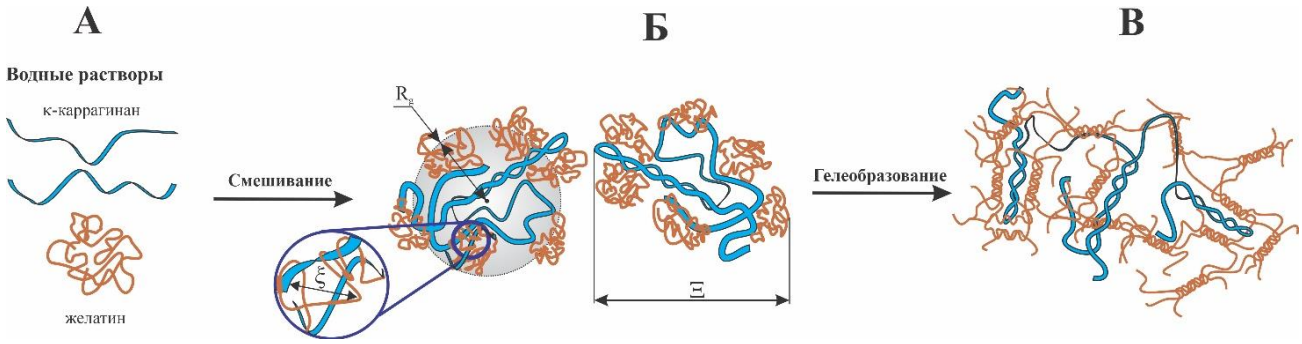


Рис. 5. (А) Условное представление исходных конформаций к-каррагинана и желатина; (Б) характерные размеры полиэлектролитных комплексов к-каррагинана и желатина; (В) возможная модель композитного белок-полисахаридного гидрогеля.

Таблица 2 – Результаты расчета структурных параметров белок-полисахаридных гидрогелей по модели цилиндрических частиц в гелях и модели геля Гаусса-Лоренца (Ξ- средний размер ПЭК, ξ - средний размер сшивок, рис. 5Б).

Образец	**T, °C**	***Модель Гаусс-Лоренца***		***Цилиндр***	
		Ξ, Å	**ξ, Å**	**R_c, Å**	**L, Å**
желатин	14	61.6	16	10.8	138.6
	35	74	16.4	11.5	134.4
желатин-УНТ	14	95	20	23.2	3896.8
	35	98.2	22.6	15.8	4589.5
к-каррагинан	14	50.8	28.3	18.3	160
	35	59.9	24.8	14.6	215.9
к-каррагинан-УНТ	14	73.2	32.6	20.3	3119.8
	35	95	22	23.3	4090.1
желатин-к-каррагинан	14	64.3	29.2	18.5	2588.4
	35	100	38	25.9	3772.7
желатин-к-каррагинан -УНТ	14	86.8	29.7	24.8	3069.6
	35	122	44.3	33.4	6324.5

Помимо небольших температурных изменений дополнительное увеличение размеров структурных элементов в присутствии УНТ связано с адсорбцией ПЭК к-каррагинан-желатин на поверхности УНТ, выполняющих функцию каркаса для формирования надмолекулярной структуры (рис. 6).

По данным МУРР присутствие УНТ не нарушает (сохраняет) существующую структуру гидрогеля на разных размерных уровнях.

Таким образом в работе показано, что переход из состояния дисперсии (золь) в состояние геля не приводит к кардинальному изменению супрамолекулярной структуры гидрогеля, а присутствие УНТ обеспечивает функцию каркаса для дополнительной стабилизации трехмерной сетки гидрогеля, при условии отсутствия внешних воздействий на систему.

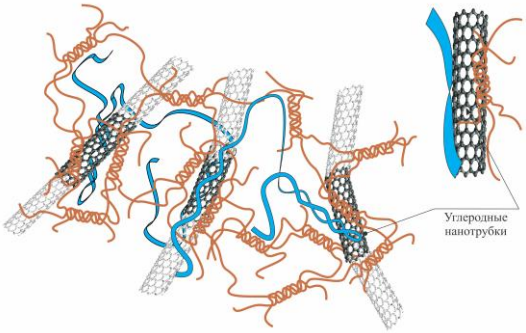


Рис. 6. Взаимодействия ПЭК к-каррагинан-желатин с поверхностью УНТ. На рисунке показаны короткие фрагменты УНТ.

2.2.3. Исследование морфологии модифицированных гидрогелей

С помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) было показано, что УНТ хорошо диспергированы по всему объему образца, без каких-либо признаков агрегации. В системе к-каррагинан-желатин-УНТ (рис. 7Б) наблюдается более регулярная полимерная сетка с более однородными волокнами по сравнению с «чистым» гидрогелем к-каррагинан-желатин (рис. 7А).

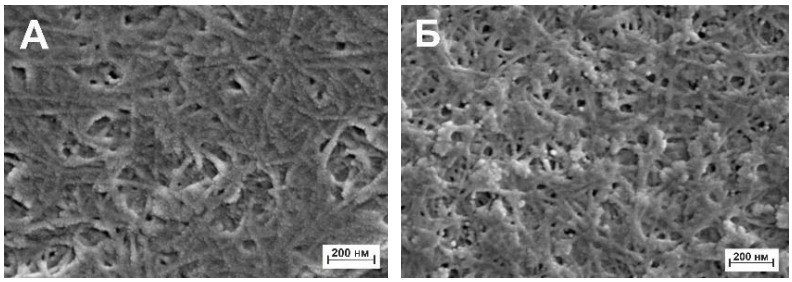


Рис 7. СЭМ-изображения образцов композиционного гидрогеля на основе:
(А) к-каррагинан-желатина и
(Б) к-каррагинан-желатина-УНТ.

Используя атомно-силовую микроскопию (АСМ) выявлено, что добавление УНТ к гидрогелю к-каррагинан-желатин приводит к снижению значения шероховатости поверхности (стандартное отклонение высот пиков) R_q = 4.13 нм по сравнению с исходным образцом R_q = *6.98* нм. Это косвенно может свидетельствовать о стабилизации надмакромолекулярной структуры ксерогеля за счет равномерного распределения УНТ в объеме гидрогеля. Данный вывод качественно подтверждает результаты анализа структуры гидрогеля, полученных на основе данных МУРР.

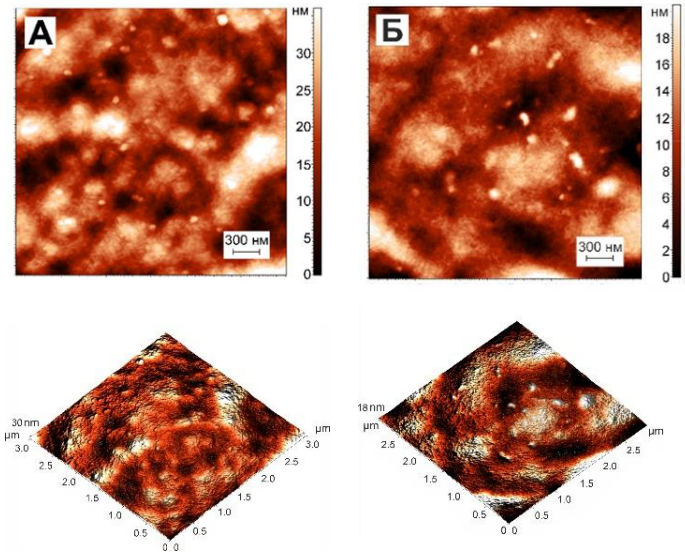


Рис. 8. Двумерные и трехмерные АСМ-изображения ксерогелей на основе: (А) к-каррагинан-желатина и (Б) к-каррагинан-желатина-УНТ.

2.3. Физико-химические и механические свойства модифицированных к-каррагинан-желатиновых гидрогелей

2.3.1. Реологические свойства гидрогелей, модифицированных углеродными нанотрубками

Для тестирования механических свойств к-каррагинан-желатиновых гидрогелей, в том числе модифицированных углеродными нанотрубками, был применен реологический метод. Во всех исследованных системах в состоянии геля (T=14°C) наблюдалось превышение на порядок модуля упругости над модулем потерь G'>G" (рис. 9А), свидетельствующее о твердоподобном (упругом) поведение гидрогеля, характеризующее наличие в образцах

устойчивых структурных связей. При амплитудах превышающий значение γ^* (граница линейности) наблюдается резкое падение модуля упругости G' и возрастание модуля потерь G", соответствующее переходу гидрогеля из твердообразного состояния в текучее. Снижение γ^* для гелей свидетельствует о более хрупкой сетке гидрогеля в присутствии УНТ. Для водной дисперсии к-каррагинан-желатин (рис. 9Б) в присутствии УНТ, модуль упругости превышает модуль потерь G'>G", что указывает на армирующий эффект УНТ даже в системе, находящейся в жидком состоянии.

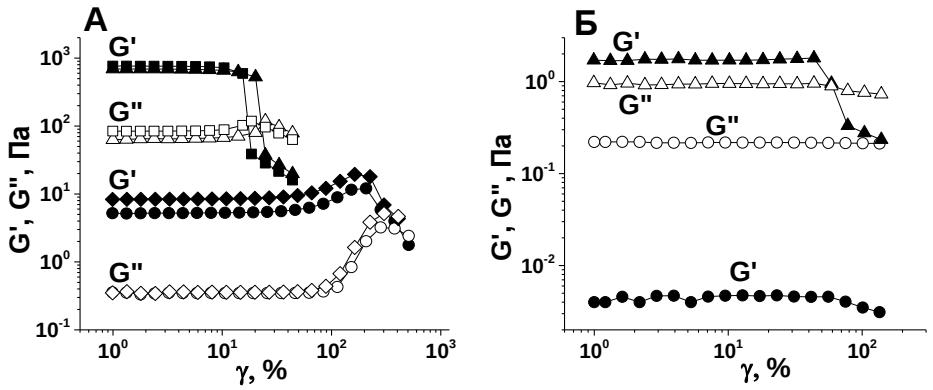


Рис. 9. Амплитудные зависимости модуля упругости G' (маркеры с заливкой) и модуля потерь G" (маркеры без заливки) гидрогелей на основе: (А) желатин (●, ○), желатин-УНТ (◆, ◇) Z=0.8 (▲, △) и Z=0.8-УНТ (■, □) при T=14°C, ω=6.28 c^{-1}; (Б) к-каррагинан-желатин (▲, △) и к-каррагинан-желатин-УНТ (■, □) при T=35°C, ω=6.28 c^{-1}.

Слабая зависимость модулей упругости G' и потерь G" от частоты была обнаружена для всех исследуемых систем, что свидетельствует о твердообразных свойствах исследуемых гидрогелей (рис. 10А). Добавление УНТ приводит к увеличению значения модуля упругости G' более чем на 15% (рис. 10А), что может свидетельствовать об модификации структурной сетки гидрогеля при внесении УНТ, например, увеличении числа узлов связывания или усилении упругой составляющей.

Значение комплексной вязкости гидрогелей на основе желатина находится на порядок ниже, чем гидрогелей к-каррагинан-желатин (рис. 10Б). Добавление УНТ во все исследуемые системы увеличивает комплексную вязкость. Все исследуемые системы проявляют неньютоновское поведение при изменении скорости сдвигового течения.

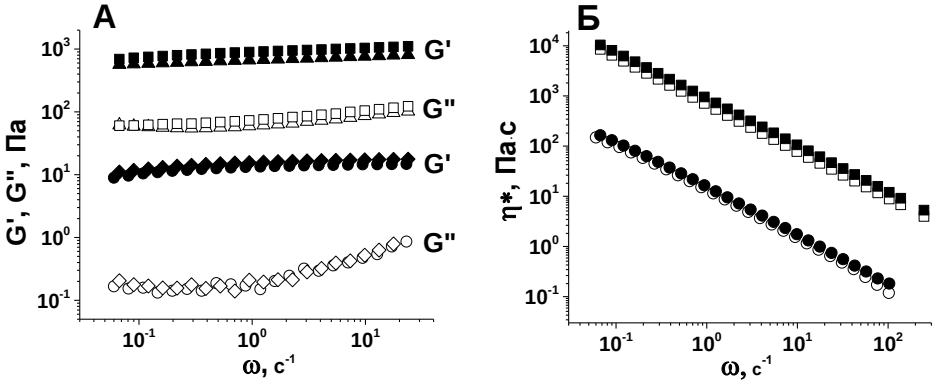


Рис. 10. Частотные зависимости (А) модуля упругости G' и модуля потерь G" гидрогелей на основе желатины (●, ○), желатины-УНТ (◆, ◇), к-каррагинан-желатин (▲, △) и к-каррагинан-желатин -УНТ (■, □) при T=14°C, γ=1%; (Б) комплексной вязкости (η*) гидрогеля на основе: желатины (○), желатины-УНТ (●), к-каррагинан-желатин (□) и к-каррагинан-желатин-УНТ (■) при T=14°C, γ=1%.

Таким образом, показано увеличение упругих и прочностных характеристик гидрогелей желатина и к-каррагинан-желатин вследствие их модификации УНТ. Упрочняющий эффект наблюдается и в структурированных водных дисперсиях (золях) к-каррагинан-желатин, что также коррелирует с выводами по данным МУРР о наличии супрамолекулярной структуры даже у системы в жидком состоянии.

2.3.2. Исследование влияния углеродных нанотрубок на температуру гелеобразования и электропроводность гидрогелей

Основной вклад в электрическую проводимость гидрогеля к-каррагинан-желатин вносят проивоионы калия, появляющиеся в результате диссоциации ионных групп к-каррагинана. Поскольку подвижность противоионов определяется структурой микроокружения, ход температурных и концентрационных зависимостей электропроводности должен отражать изменения структуры гидрогелей.

Большинство полученных зависимостей (за исключением систем без и с минимальным количеством к-каррагинана) имеют нелинейный характер (рис. 11). В системах с бóльшим содержанием полисахарида электропроводность уменьшается с понижением температуры, что связано с гелеобразованием в системе. На температурных зависимостях четко прослеживаются три области, относящиеся к состоянию жидкой дисперсии в области более высоких температур, состоянию геля в области более низких температур, а также промежуточная переходная область перехода жидкой дисперсии в гель (золь-гель) (рис. 11).

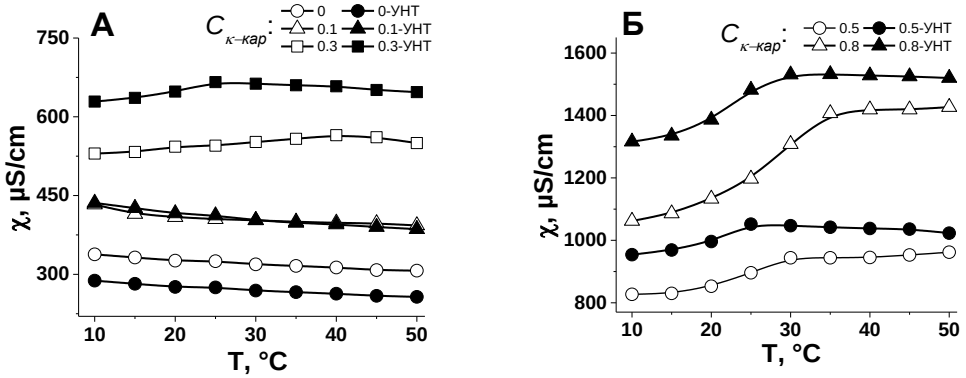


Рис. 11. Температурные зависимости удельной электрической проводимости системы к-каррагинан-желатин (пустые символы) при постоянном содержании желатина (1 мас. %) и различном содержании к-каррагинана (мас. %), указанных на рисунке. Образцы с УНТ представлены закрашенными символами.

Переходная сигмоидальная область по мере увеличения концентрации к-каррагинана смещается в сторону более высоких температур. Состояния геля характеризуются меньшей электрической проводимостью, что связано с более высокой вязкостью среды в состоянии геля. Добавление УНТ не меняет сигмоидальную форму зависимостей, хотя несколько смещает гелеобразование в сторону низких температур и существенно повышает общий уровень электропроводности – очевидно, свой вклад в общую электропроводность вносит электронная проводимость УНТ, которые определенным образом ориентированы в пространстве гидрогеля.

Таким образом, установлена корреляция между морфологией гидрогелей и их физико-химическими свойствами на примере изменения удельной электрической проводимости. Показано, что проводимость отражает структурные перестройки в исследованных системах.

2.4. Влияние катионов металлов на структуру гидрогелей

На гидрогеле альгината натрия исследовано изменение его структуры при взаимодействии с катионами двухвалентных металлов. Двухвалентные катионы замещают одновалентный ион натрия и индуцируют ассоциацию цепей за счет поперечной физической сшивки блоков гулуроновой кислоты соседних молекул альгината, известной как «модель яичной упаковки» (Morris *et al.,* 1978). Обнаруженные различия микроструктуры капсул в присутствии различных двухвалентных катионов могут иметь высокую практическую значимость, поскольку, могут влиять на эффективность связывания иммобилизованных соединений и скорость их высвобождения.

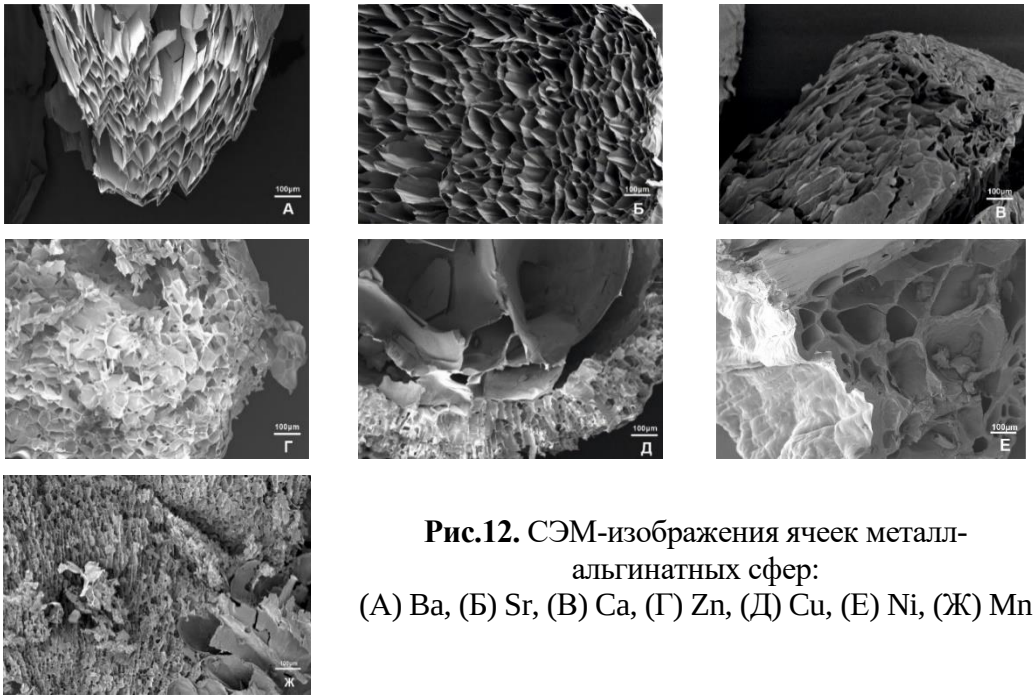


Рис.12. СЭМ-изображения ячеек металл-альгинатных сфер:
(А) Ba, (Б) Sr, (В) Ca, (Г) Zn, (Д) Cu, (Е) Ni, (Ж) Mn

Внутренняя морфология сфер изучена с помощью сканирующей электронной микроскопии. Сравнение морфологии полученных гидрогелей позволяет сделать вывод о том, что разные катионы по-разному ориентируют полисахаридные цепи, что приводят к различным структурным эффектам (рис. 12) – поры в зависимости от типа иона характеризуются широким спектром размеров от 20 - 40 мкм для Ba^{2+} (рис. 12А) до 80 - 200 мкм для Ni^{2+} (рис. 12Е).

2.5. Кинетика высвобождения биологически активных веществ из белок-полисахаридных гидрогелей

При включении биологически активных веществ (БАВ) в биополимерный гель важными параметрами, которые определяют возможность контролируемого высвобождения инкапсулируемого вещества из полимерной системы, являются молекулярная масса и заряд молекулы БАВ, концентрация белок-полисахаридной сетки, сшивающие агенты, pH, температура, модифицирующих добавки (Barba *et al.,* 2012, Baig *et al.,* 2021).

Для оценки инкапсуляции и пролонгированного высвобождения БАВ из альгинат-желатиновых и κ-каррагинан-желатиновых гидрогелей были использованы соединения: красители – катионный бриллиантовый зеленый (БЗ), анионный метиловый оранжевый (МО) и нейтральный флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ); водорастворимые витамины группы В рибофлавин (B_2) и фолиевая кислота (B_9); ферменты липаза *Candida rugose* и бактериальная РНКаза биназа *Bacillus pumilus*.

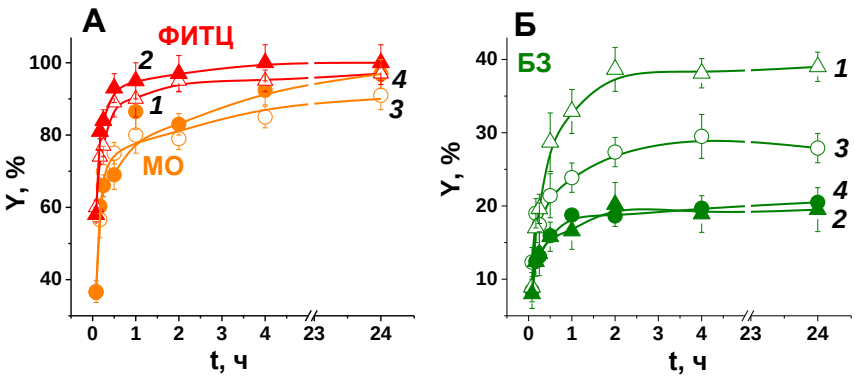
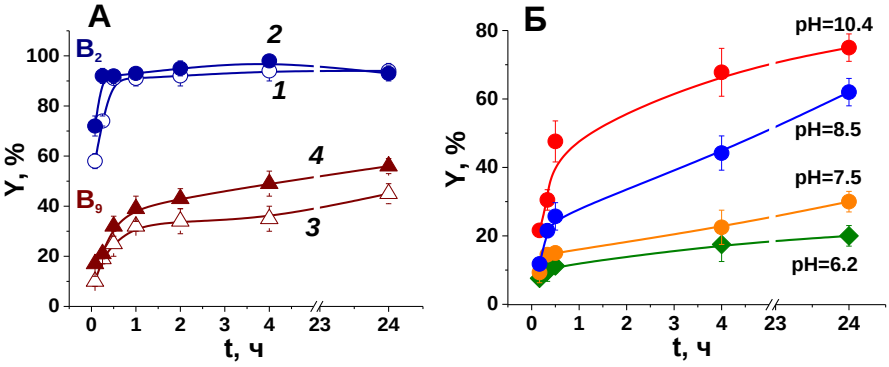


Рис. 13. Кинетика высвобождения красителей из альгинат-желатиновых сфер: (А) 1 – ФИТЦ; 2 – ФИТЦ-УНТ; 3 – МО; 4 – МО-УНТ (Б) 1 – БЗ; 2 – БЗ-УНТ (2 мас. % альгината) и 3 – БЗ; 4 – БЗ-УНТ (0.7 мас. % альгината).

Альгинат-желатиновые сферы слабо связывают анионный МО и нейтральный ФИТЦ (рис. 13А), а добавление УНТ практически не влияло на удерживающую способность систем. Сконструированные системы эффективно удерживают положительно заряженный зонд (БЗ) за счет электростатического взаимодействия с анионными группами альгината (рис. 13Б). Было показано, что, снижая концентрацию полисахарида, можно регулировать скорость высвобождения этого зонда (рис. 13Б). Добавление УНТ привело к существенному увеличению связывания БЗ и уменьшению скорости его высвобождения.

В отличие от анионного рибофлавина (B_2), фолат-анион (B_9) эффективно удерживается в альгинатном гидрогеле (рис. 14А). Вероятно, это связано с тем, что ионы Ca^{2+} выступают в качестве сшивающего реагента, и молекулы фолиевой кислоты прочно фиксируются в альгинатной матрице за счет связи $-COO^{-}_{B9}-Ca^{2+}-COO^{-}_{альгинат}$.

Рис. 14. Кинетика высвобождения витаминов из альгинат-желатиновых сфер: (А) 1 - B_2; 2 – B_2-УНТ; 3 – B_9; 4 – B_9-УНТ; (Б) выход B_9 в зависимости от pH.



Вариация pH раствора приводит к изменению скорости выхода витамина B_9 из альгинатного гидрогеля (рис. 14Б). В щелочной среде при pH = 8.5 и 10.4 выход витамина ускоряется за счет биодеградации (эрозии) сфер и щелочного гидролиза связи между фолиевой кислотой и кальцием.

Витамин B_9 из гидрогеля к-каррагинан-желатин высвобождался быстрее по сравнению с системой альгинат-желатин (рис. 15А), так как в системе с альгинатом присутствуют катионы Ca^{2+}, способные дополнительно удерживать витамин B_9 внутри гидрогеля. Добавление УНТ ускоряет выход витаминов из к-каррагинан-желатинового гидрогеля на 20%.

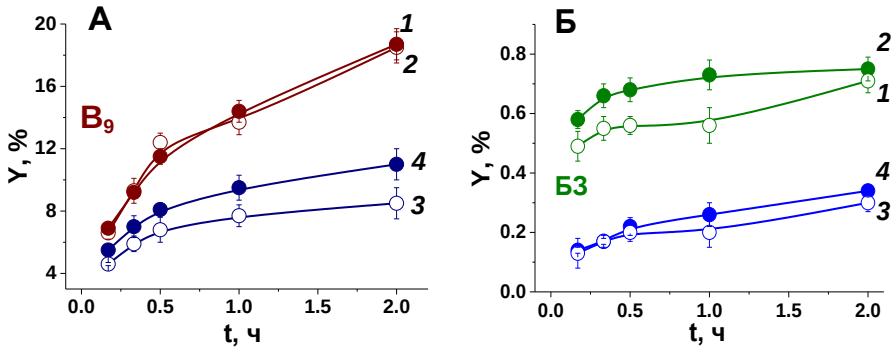


Рис. 15. Кинетика высвобождения (А) витамина B_9 и (Б) красителя БЗ из:
1 – к-каррагинан-желатина;
2 – к-каррагинан-желатина-УНТ;
3 – альгинат-желатина;
4 – альгинат-желатина-УНТ.

Катионный краситель БЗ практически не выходит из полисахаридных гидрогелей (рис. 3.15Б), так как в структуре полисахаридов высокая концентрация отрицательных зарядов (анионные карбоксильная и сульфатная группы), которые эффективно связывают зонд. Добавление УНТ не оказывает существенного влияния на инкапсулирующую способность сконструированных систем по отношению к БЗ.

Пероральное введение терапевтических белков встречает ряд трудностей, связанных с потерей активности ферментов. В качестве инкапсулирующих зондов использовались биназа *Bacillus pumilus* и липаза *Candida rugosa* (рис. 16).

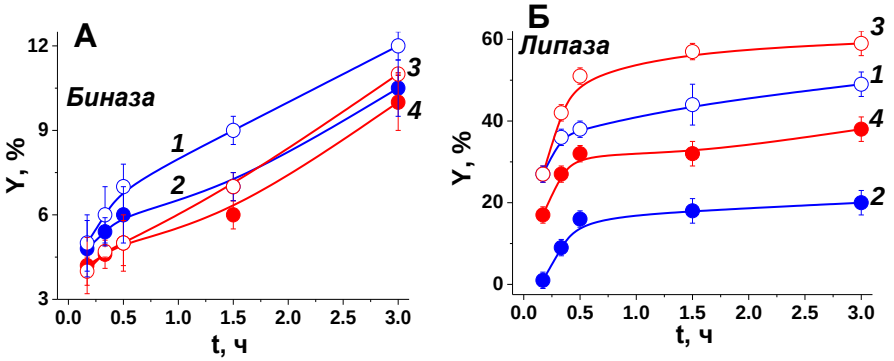


Рис. 16. Кинетика высвобождения (А) биназы *Bacillus pumilus* и (Б) липазы *Candida rugosa* из:
1 – к-каррагинан-желатин;
2 – к-каррагинан-желатин-УНТ;
3 – альгинат-желатин;
4 – альгинат-желатин-УНТ.

Слабый выход биназы вероятно связан с ее противоположным зарядов (+3.3) по сравнению с анионными полисахаридами и ее сильным электростатическим связыванием в гидрогелевой матрице. Высокий выход липазы связан с отсутствием электростатического связывания между анионным ферментом (заряд -18.9 при pH 7.4) и отрицательно заряженными альгинатом и к-каррагинаном, являющимися компонентами гидрогелевой матрицы (рис. 16Б). При добавлении УНТ скорость выхода липазы существенно замедляется, что вероятно связано с дополнительным структурированием гидрогелей, как было показано нами методами рентгеновской дифракции, и, возможно, возникновением дополнительных стерических препятствий со стороны УНТ для крупных молекул липазы (ММ=57 кДа).

Таким образом, можно сделать вывод, что пространственная структура гидрогелей и их химический состав оказывают существенное влияние на связывание БАВ гидрогелевой матрицей и могут использоваться для управления пролонгацией выхода лекарственных и диагностических средств. Также, показано, что армирование белок-полисахаридных гидрогелей углеродными нанотрубками одновременно с изменением структурных характеристик оказывает влияние на иммобилизационную емкость гидрогелей.

2.6. Влияние полисахаридной матрицы на структуру ферментных препаратов

Контакт фермента с гидрогелем может изменить его структуру и функциональные свойства. При анализе влияния полисахаридной матрицы на структуру биназы *Bacillus pumilus* и липазы *Candida rugosa* использовалась модель дискретных классов триптофанов в белках (Reshetnyak *et al.*, 2001). На рисунке 17 представлены суммарные спектры триптофановой флуоресценции 3 остатков триптофана с номерами 43, 70, 93 и 5 триптофановых остатков с номерами 119, 161, 188, 221 для липазы. В таблице 3 представлены значения максимумов флуоресценции биназы и липазы в альгинате натрия различной концентрации, а также результаты разложения суммарных спектров на компоненты.

Для липазы наблюдается батохромный (красный) сдвиг максимума суммарной флуоресценции на 5 нм, отдельных компонент – на 7 (триптофан класса III) и 3 нм (триптофан класса I) (рис. 17(1)). Существенные сдвиги свидетельствуют о значимом изменении микроокружения триптофановых остатков липазы на более полярное (рис 17(1),

табл. 3). Это может быть вызвано тем, что альгинат натрия выполняет роль активирующей поверхности и структурные изменения липазы в иммобилизованном состоянии не должны уменьшать ее активность. Для биназы был определен слабый голубой сдвиг максимума флуоресценции триптофана I класса при увеличении концентрации альгината и отсутствии явных изменений положения флуоресценции триптофанов III класса (рис. 17(2)). Гипсохромный (голубой) сдвиг свидетельствует о компактизации молекулы фермента при взаимодействии с полисахаридной матрицей. Возможно, это связано с электростатическим притяжением фермента и полисахаридной сетки гидрогеля, упомянутым в предыдущем разделе.

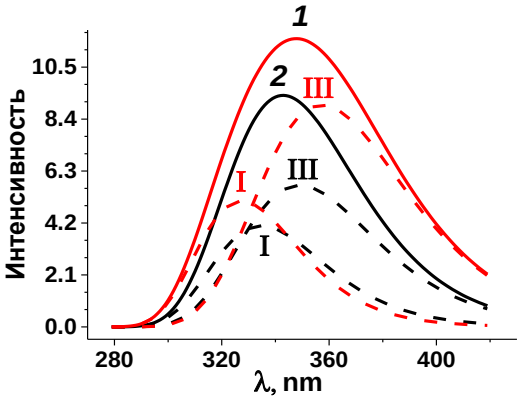


Рис. 17. Разложение спектров триптофановой флуоресценции 1 – липазы и 2 – биназы в альгинатном гидрогеле на два компонента с центрами 334.8 (триптофан класса I) и 364.67 нм (триптофан класса III) – липаза; 334.8 (триптофан класса I) и 349.0 нм (триптофан класса III) – биназа.

Таблица 3. Положение максимумов суммарной флуоресценции ($\lambda_{макс}$) остатков триптофана липазы и биназы и положения максимумов компонент ($\lambda^{I}_{макс}$ и $\lambda^{III}_{макс}$) в растворах альгината натрия разной концентрации ($C_{АН}$)

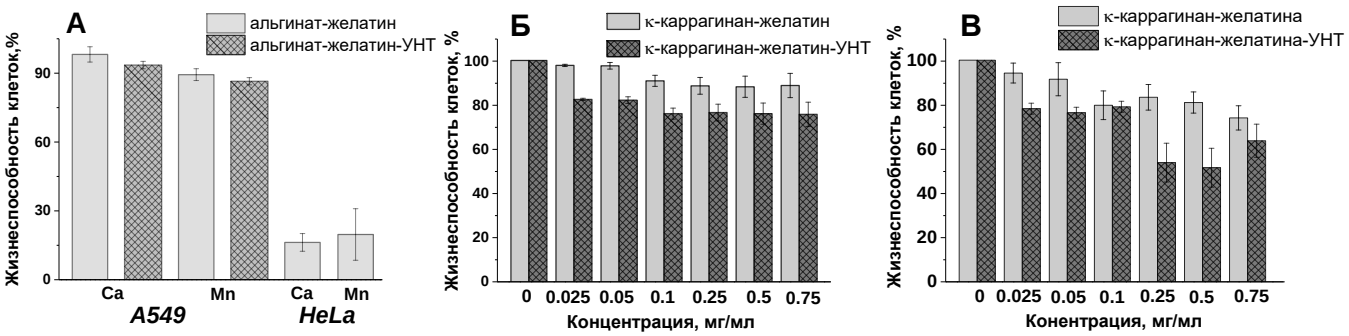
$C_{АН}$, %	$\lambda_{макс}$, нм	$\lambda^{I}_{макс}$, нм	$\lambda^{III}_{макс}$, нм	$\lambda_{макс}$, нм	$\lambda^{I}_{макс}$, нм	$\lambda^{III}_{макс}$, нм
	Липаза			*Биназа*		
0	348	327.41	357.3	343	334.78	348.98
0.001	348	327.61	357.53	343	334.60	348.69
0.002	348	328.87	358.8	343	334.31	348.68
0.005	349	329.64	359.52	343	333.88	348.80
0.01	349	329.78	359.68	343	333.95	348.97
0.02	349	331.04	361.3	343	333.64	348.84
0.04	350	330.71	361.06	343	333.68	348.74
0.08	350	332.5	363.35	343	333.14	348.49
0.16	351	332.91	364.67	343	333.46	349.05

Установлено, что взаимодействие фермента с гидрогелевой матрицей зависит от величины и знака электрического заряда молекулы фермента, определяя эффект связывания и пролонгации выхода иммобилизованных ферментов.

2.7. Определение биосовместимости сконструированных белок-полисахаридных гидрогелей в присутствии углеродных нанотрубок

Для практического использования сконструированных гидрогелевых систем для иммобилизации БАВ необходимо оценить их цитотоксичность. Цитотоксичность исследуемых систем была изучена клетках опухолевых линий рака шейки матки человека HeLa и клетки аденокарциномы легких человека A549.

Оказалось, что за исключением сильного токсического действия Ca^{2+} и Mn^{2+} в отношении клеток HeLa (рис. 18А) все остальные тесты показали достаточно невысокую цитотоксичность гидрогелевых систем, в том числе и в присутствии углеродных нанотрубок. Тем не менее обнаруженные примеры высокой цитотоксичности поднимает вопрос о необходимости постоянного контроля токсичности вновь конструируемых систем. При этом существует небольшая тенденция к усилению токсических свойств данной системы с увеличением концентрации гидрогеля в тестируемой системе. УНТ показали хорошую биосовместимость (рис. 18Г), а добавление фетальной сыворотки к культуральной среде полностью сняло токсичность УНТ.



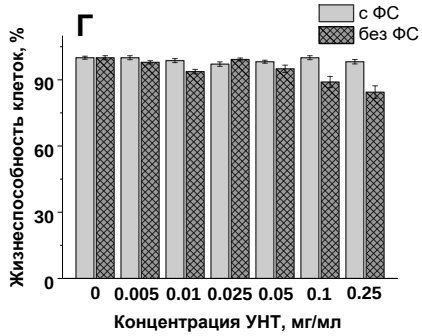


Рис. 18. Жизнеспособность клеток линии: (А) HeLa и A549 после обработки альгинат-желатиновых и альгинат-желатиновых-УНТ сфер, стабилизированных Ca^{2+} и Mn^{2+}; (Б) HeLa в зависимости от концентрации УНТ в присутствии и (В) в отсутствие фетальной сыворотки (ФС); (Г) HeLa в зависимости от концентрации УНТ в присутствии и в отсутствие фетальной сыворотки (ФС).

Поскольку биосовместимость является основным свойством материалов, которые будут использоваться в биомедицинской области, особенно материалы, используемые *in vivo*, таким образом улучшая биосовместимость УНТ, можно улучшить их применение в биомедицинской области.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования, проведенные в диссертационной работе, позволили получить новую информацию о структуре и свойствах белок-полисахаридных гидрогелей модифицированных углеродными нанотрубками.

Полученные результаты показали, что сочетание методов порошковой рентгеновской дифрактометрии, малоуглового рентгеновского рассеяния, атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии, реологии и кондуктометрии является эффективным подходом для характеристики структуры и свойств гидрогелей, армированных углеродными нанотрубками.

Результаты рентгеноструктурного анализа позволили получить качественную и количественную информацию о супрамолекулярной структуре гидрогелей к-каррагинан-желатин, охарактеризовать трансформацию структуры гидрогеля, связанную с присутствием углеродных нанотрубок. С помощью порошковой рентгеновской дифракции было показано, что взаимодействие полисахарида и белка меняет фазовую структуру образца, приводит к гомогенизации системы с образованием новой супрамолекулярной структуры, при этом добавление нанотрубок оказывает дополнительный стабилизирующий эффект. Методом малоуглового рентгеновского рассеяния количественно охарактеризована структура гидрогеля и ее трансформация, связанная с присутствием УНТ. Анализ структуры исходной и модифицированной углеродными нанотрубками системы в рамках гелевой модели Гаусса-Лоренца показал хорошее согласие между экспериментальными и расчетными данными малоуглового рассеяния. Экспериментально установлено, что структура, образующаяся в гидрогеле в системе к-каррагинан-желатин в дисперсном состоянии, определяет супрамолекулярную структуру системы в состоянии геля. Добавление УНТ в систему сохраняет неизменным тип супрамолекулярной структуры. Углеродные нанотрубки,

присутствующие в системе, выступают в качестве дополнительного каркаса для формирования трехмерной сети биополимеров.

С помощью сканирующей электронной микроскопии получены результаты, свидетельствующие о том, что УНТ хорошо диспергированы по всему объему образца, без каких-либо признаков агрегации.

Благодаря атомно-силовой микроскопии получены изображения однородных гидрогелевых систем. Снижение значения шероховатости поверхности при добавлении УНТ может косвенно свидетельствовать о стабилизации макромолекулярной структуры биополимерного комплекса и достаточно равномерном распределении УНТ в к-каррагинан-желатиновой матрице.

С помощью реологических измерений было показано, что включение углеродных нанотрубок в биополимерные композиты заметно усиливает их механические свойства. Очевидно, это является следствием формирования более «жесткой» структуры геля, модифицированного УНТ, что также отражается на вязкость систем в жидком дисперсном состоянии.

Наличие корреляции между супрамолекулярной структурой гидрогелей и их физико-химическими свойствами продемонстрировано на примере изменения удельной электрической проводимости гидрогелей в присутствии УНТ. Показано, что проводимость связана со структурой гидрогелей и структурными перестройками в исследованных системах. В ходе исследования установлено, что добавление УНТ к гидрогелям увеличивает их электропроводность, очевидно за счет электронной проводимости углеродных нанотрубок, включенных в структуру гидрогелей.

Проведенные исследования по иммобилизации биологических-активных веществ (БАВ) в гидрогелевой матрице показали, что регулировать скорость высвобождения БАВ (ферментов, витаминов и красителей) можно путем выбора катионов металлов при формировании гидрогелей на основе альгината натрия. Получены данные, свидетельствующие, что стабильность гидрогелевых микросфер на основе альгината натрия зависит от pH водной среды, влияя на скорость высвобождения БАВ - чем выше значение pH, тем быстрее высвобождается иммобилизованное вещество из полимерной матрицы. Установлено, что взаимодействие фермента с гидрогелевой матрицей зависит от величины и знака электрического заряда молекулы фермента, определяя эффект пролонгации выхода иммобилизованных ферментов. Углеродные нанотрубки дают дополнительный регулирующий эффект на эффективность иммобилизации и пролонгированный выход исследованных БАВ, включая ферменты, витамины и красители.

Охарактеризована цитотоксичность сконструированных гидрогелевых конструкций. За исключением сильного токсического действия Ca^{2+} и Mn^{2+} в отношении клеток HeLa все остальные тесты показали достаточно небольшую цитотоксичность гидрогелевых систем, в том числе и в присутствии углеродных нанотрубок. Тем не менее обнаруженные примеры высокой цитотоксичности поднимают вопрос о необходимости постоянного контроля токсичности вновь конструируемых систем.

Решение поставленных задач о влиянии углеродных нанотрубок на структуру и свойства белок-полисахаридных комплексов способствует пониманию взаимосвязи «состав-структура-свойство» для ответа на ряд фундаментальных вопросов о взаимодействиях и супрамолекулярной структуре композитных систем на основе белков и полисахаридов. Полученные результаты будут полезны при инженерии различных биотехнологических композиций на основе белков и полисахаридов.

ВЫВОДЫ

1. На основании проведенных экспериментов по рентгеновскому рассеянию впервые количественно охарактеризована супрамолекулярная структура физических гидрогелей к-каррагинан-желатин без и с добавлением УНТ. Показано, что взаимодействие полисахарида и белка приводит к гомогенизации системы и формированию гидрогеля с единой супрамолекулярной структурой.
2. Методами рентгеновского рассеяния впервые показано, что в гидрогеле к-каррагинан-желатин супрамолекулярная структура формируется даже при высокой температуре в состоянии золя, сохраняясь при понижении температуры и переходе системы в гелеобразное состоянии.
3. Установлено, что добавление УНТ не изменяет морфологию существующей супрамолекулярной структуры гидрогеля лишь незначительно увеличивая характеристические размеры белок-полисахарид полиэлектролитных комплексов и модулируя их механические и электропроводящие свойства.
4. Разработаны гидрогели на основе альгината натрия с перекрестными сшивками цепей катионами двухвалентных металлов (Ba^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}), которые в зависимости от типа иона характеризуются широким спектром пор – 20 - 40 мкм для Ba^{2+} до 80 - 200 мкм для Ni^{2+}.
5. Показано, что структура гидрогелей и их химический состав оказывают существенное влияние на связывание биологически-активных веществ и могут использоваться для управления скоростью и временем их высвобождения.
6. Установлено, что за исключением сильного токсического действия Ca^{2+} и Mn^{2+} в отношении клеток HeLa все остальные тесты показали невысокую цитотоксичность гидрогелевых систем, в том числе и в присутствии углеродных нанотрубок.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Zueva, O.S. Carbon Nanotubes in Composite Hydrogels Based on Plant Carbohydrates / O.S. Zueva, **A.O. Makarova**, Yu.F. Zuev //Materials Science Forum. –2019. – N. 945. – P. 522-527. (Scopus Q3, WoS Q3).
2. **Makarova, A.O.** Use of Natural Biopolymers to Create Nanocomposite Materials / A.O. Makarova, L.R. Bogdanova, O.S. Zueva // Solid State Phenomena. – 2020. – N 299. – P. 299-304. (Scopus Q3, WoS Q3).
3. Зуева, О.С. Структурные особенности композиционного белок-полисахаридного гидрогеля в присутствии углеродного наноматериала / О.С. Зуева, А.Т. Губайдуллин, **А.О. Макарова**, Л.Р. Богданова, Л.Я. Захарова, Ю.Ф. Зуев // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2020. – N 3. – С. 581-589. (Scopus Q3, WoS Q3).
4. Богданова, Л.Р. Инкапсуляция диагностических красителей в полисахаридной матрице, модифицированной углеродными нанотрубками / Л.Р. Богданова, **А.О. Макарова**, О.С. Зуева, Л.Я. Захарова, Ю.Ф. Зуев // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2020. – N 3. – С. 590-595. (Scopus Q3, WoS Q3).
5. **Макарова, А.О.** Биотехнологические приемы использования полисахаридных гидрогелей для доставки витаминов и диагностических маркеров / А.О. Макарова, О.С. Зуева, Л.Р. Богданова, В.В. Сальников Ю.Ф. Зуев // Бутлеровские сообщения. – 2021. – Т.68. – №10. – С.147-155. (ВАК).
6. Gubaidullin, A.T. Modulation of molecular structure and mechanical properties of κ-carrageenan-gelatin hydrogel with multi-walled carbon nanotubes / A.T. Gubaidullin, **A.O. Makarova**, S.R. Derkach, N.G. Voron'ko, A.I. Kadyirov, S.A. Ziganshina, V.V. Salnikov, O.S. Zueva, Yu.F. Zuev // Polymers. – V. 14. – N. 12. – 2346. (Scopus Q1, WoS Q1).

7. Bogdanova, L.R. Alginate-based hydrogel as delivery system for therapeutic bacterial RNase / L.R. Bogdanova, P.V. Zelenikhin, **A.O. Makarova**, O.S. Zueva, V.V. Salnikov, Yu.F. Zuev, O.N. Ilinskaya // Polymers. – V. 14. – N. 12. – 2461. (Scopus Q1, WoS Q1).

Тезисы докладов

1. **Makarova, A.O.** Improvement of viscoelastic characteristics of polysaccharide-protein hydrogels by carbon nanotubes for the tasks of regenerative medicine / A.O. Makarova, O.S. Zueva and Yu. F. Zuev // Materials of conference Kazan precision medicine. – Kazan, 2018. – P. 25.
2. **Макарова А.О.** Структура и свойства гидрогелей к-каррагинан-желатины в присутствии углеродных нанотрубок // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2018» [Электронный ресурс] – Москва, 2018.
3. **Макарова, А.О.** Влияние углеродных нанотрубок на электропроводящие и механические свойства полисахаридных гидрогелей/ А.О. Макарова, О.С. Зуева, Ю.Ф. Зуев // Сборник тезисов III международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Казань, 2018. – С. 54.
4. Зуева, О.С. Возможности кондуктометрии для контроля морфологии композиционных белок-полисахаридных гидрогелей / О.С. Зуева, **А.О. Макарова**, Ю.Ф. Зуев // Научные труды IX Российского симпозиума «Белки и пептиды» – Дагомыс, 2019. – Т. 2. – С. 256.
5. **Макарова, А.О.** Модифицирующее действие углеродных нанотрубок на структуру и свойства белок-полисахаридных гидрогелей / А.О. Макарова, О.С. Зуева, Ю.Ф. Зуев // Научные труды IX Российского симпозиума «Белки и пептиды». – Дагомыс, 2019. – Т. 2. – С. 263.
6. **Makarova, A.O.** Encapsulation of diagnostic dyes in polysaccharide matrix modified with carbon nanotubes / A.O. Makarova, L.R. Bogdanova, O.S. Zueva, Yu.F. Zuev // Тезисы докладов школы-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) – Казань, 2019. – С.24.
7. Богданова, Л.Р. Альгинатные гидрогели для современных природоохранных технологий / Л.Р. Богданова, **А.О. Макарова**, О.С. Зуева, Ю.Ф. Зуев // Сборник материалов XV Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2020». –Севастополь, 2020. – С. 22-23.
8. **Макарова, А.О.** Использование гидрогелей с углеродными нанотрубками в качестве реагентов для нефтеотдачи / А.О. Макарова, О.С. Зуева, Ю.Ф. Зуев // Сборник материалов XV Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2020». –Севастополь, 2020. – С. 38-39.
9. **Макарова, А.О.** Композиционные гидрогели армированные углеродными нанотрубками для применения в нефтехимии / А.О. Макарова, О.С. Зуева, Ю.Ф. Зуев // Сборник материалов VI Национальной научно-практической конференции «Приборостроение и автоматизированный электропривод в топливно-энергетическом комплексе и жилищно-коммунальном хозяйстве». Казань, 2020. – Т. 2. – С. 49-50.
10. **Макарова, А.О.** Использование белок-полисахаридных гидрогелей для повышения нефтеотдачи / А.О. Макарова, О.С. Зуева, Ю.Ф. Зуев // Сборник материалов VI Национальной научно-практической конференции «Приборостроение и автоматизированный электропривод в топливно-энергетическом комплексе и жилищно-коммунальном хозяйстве». – Казань, 2020. – Т. 2. – С. 50-51.
11. **Макарова А.О.** Влияние углеродных нанотрубок на структурно-механические свойства желатин-к-каррагинановых гидрогелей // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021» [Электронный ресурс] – Москва, 2021.

12. **Makarova, A.O.** Structural characteristics of protein-polysaccharide hydrogels and their changes associated with carbon nanomaterials addition / A.T. Gubaidullin, O.S. Zueva, Yu.F. Zuev // Тезисы докладов III школы-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) – Казань. – 2021. – С. 53.

13. **Макарова, А.О.** Инкапсуляция биологически-активных веществ в биополимеры, модифицированные УНТ / **Макарова А.О.**, Зуева О.С., Зуев Ю.Ф. // Сборник Тезисов IV Всероссийской с международным участием школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» / Отв. ред. А.В. Герасимов. [Электронный ресурс] – Казань.: КФУ, 2021. – С. 130.

14. **Макарова, А.О.** Влияние полисахаридной матрицы на структуру ферментных препаратов / **Макарова А.О.**, Зуева О.С., Зуев Ю.Ф. // Сборник Тезисов IV Всероссийской с международным участием школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» / Отв. ред. А.В. Герасимов. [Электронный ресурс] – Казань.: КФУ, 2021. – С. 131.

15. Богданова, Л.Р. Инкапсуляция ферментных препаратов в полисахаридную матрицу / Л.Р. Богданова, **А.О. Макарова**, О.Н. Макшакова, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов Международной юбилейной конференции, посвященной 100-летию основания кафедры микробиологии в Казанском университете [Электронный ресурс] – Казань: КФУ. – 2021. – С. 30

16. **Макарова, А.О.** Биосовместимость белок-полисахаридных гидрогелей в присутствии углеродных нанотрубок / **А.О. Макарова**, Л.Р. Богданова, П.В. Зеленихин, О.С. Зуева, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов Международной юбилейной конференции, посвященной 100-летию основания кафедры микробиологии в Казанском университете [Электронный ресурс] – Казань: КФУ. – 2021. – С. 56.

17. Зуев, Ю.Ф. Физические гидрогели на основе к-каррагинана и желатина для биомедицинских применений. Микроструктура и реология в присутствии углеродных нанотрубок / Ю.Ф. Зуев, **А.О. Макарова**, О.С. Зуева, С.Р. Деркач, С.А. Зиганшина, А.Т. Губайдуллин // Научные труды III Объединенного научного форума, VII Съезда физиологов СНГ, VII Съезда биохимиков России, X Российского симпозиума «Белки и пептиды» – М.: Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С.188.

18. Зуева, О.С. Полисахаридные гидрогели для доставки терапевтических ферментов, витаминов и диагностических маркеров / О.С. Зуева, **А.О. Макарова**, Л.Р. Богданова, В.В. Сальников, Д.А. Файзуллин, П.В. Зеленихин, О.Н. Ильинская, Ю.Ф. Зуев // Научные труды III Объединенного научного форума, VII Съезда физиологов СНГ, VII Съезда биохимиков России, X Российского симпозиума «Белки и пептиды» – М.: Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С.188.