

КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ –  
ОБОСОБЛЕННОЕ СТРУКТУРНОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА «КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

---

*На правах рукописи*

**Макарова Анастасия Олеговна**

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

1.5.2 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук,  
профессор Ю.Ф. Зуев

Казань – 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1. Основные сведения о белке, полисахаридах и их комплексах, используемых в работе.....	12
1.2 Основные сведения о белок-полисахаридных гидрогелях .....	23
1.3 Структура и свойства белок-полисахаридных гелей. Экспериментальные методы изучения и медицинские приложения .....	29
1.4 Углеродные нанотрубки, как модификатор свойств белок-полисахаридных гидрогелей.....	40
1.5 Формулировка цели исследования.....	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	48
2.1 Объекты исследования .....	48
2.1.1 Приготовление растворов на основе белка, полисахаридов и углеродных нанотрубок .....	51
2.2 Метод турбидиметрического титрования.....	52
2.3 Порошковая рентгеновская дифрактометрия .....	52
2.4 Малоугловое рентгеновское рассеивание .....	54
2.5 Метод сканирующей электронной микроскопии .....	58
2.6 Метод атомно-силовой микроскопии .....	59
2.7 Реологический метод .....	60
2.8 Кондуктометрический метод .....	62
2.9 Высвобождение биологически-активных соединений из гидрогелевой матрицы .....	62
2.10 Флуоресцентная спектроскопия .....	65
2.11 МТТ-тест .....	65

2.12	Статистическая обработка результатов исследования.....	66
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....		67
3.1.	Состав стехиометричных к-каррагинан-желатиновых комплексов.....	67
3.2	Структурный анализ к-каррагинан-желатиновых комплексов, в том числе модифицированных углеродными нанотрубками.....	69
3.2.1	Анализ фазового состояния сконструированных систем методом порошковой рентгеновской дифракции .....	69
3.2.2	Структурные характеристики гидрогелей по данным малоуглового рентгеновского рассеяния.....	73
3.3	Исследование морфологии гидрогелей с помощью сканирующей электронной микроскопии .....	92
3.4	Изучение макромолекулярной структуры гидрогелей методом атомно-силовой микроскопии .....	93
3.5	Физико-химические и механические свойства модифицированных к-каррагинан-желатиновых гидрогелей.....	95
3.5.1	Реологические свойства гидрогелей, модифицированных углеродными нанотрубками .....	95
3.5.2	Исследование влияния углеродных нанотрубок на температуру гелеобразования и электропроводность гидрогелей.....	100
3.6	Влияние катионов металлов на структуру гидрогелей.....	103
3.7	Кинетика высвобождения биологически активных веществ из белок-полисахаридных гидрогелей.....	108
3.8	Влияние полисахаридной матрицы на структуру ферментов.....	114
3.9	Цитотоксичность белок-полисахаридных гидрогелей в присутствии углеродных нанотрубок.....	119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....		123
ВЫВОДЫ .....		126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		127

## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АСМ – атомно-силовая микроскопия
- БЗ – бриллиантовый зеленый
- МО – метиловый оранжевый
- МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки
- МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние
- ОУНТ – одностенные углеродные нанотрубки
- ПРД – порошковая рентгеновская дифракция
- ПЭК – полиэлектролитный комплекс
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
- ТРИС – трис(гидроксиметил)аминометан
- УФ – ультрафиолетовое излучение
- УНТ – углеродные нанотрубки
- ФИТЦ – флуоресцеин изотиоцианат

## ВВЕДЕНИЕ

**Постановка проблемы и ее актуальность.** Поступательное развитие науки в РФ в современных условиях требует углубления фундаментальных знаний в тесном сочетании с их практическим применением. Развитие новых приемов для задач биотехнологии и медицины требует более детальной информации о структуре биополимеров и их комплексов. Перспективным молекулярным материалом являются композиции природных полимеров биологического происхождения – белки и полисахариды, для которых характерны высокая биосовместимость и биodeградируемость.

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 функциональных супрамолекулярных структур на их основе 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 систему для широкого спектра агротехнических и биомедицинских применений благодаря своей биосовместимости, превосходной проницаемости для транспорта питательных веществ, метаболитов и сходству с нативным внеклеточным матриксом (Baranwal *et al.*, 2022; Patra *et al.*, 2018).

Более 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 (Almawash *et al.*, 2022; Eslahi *et al.*, 2016).

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 высокой 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 внеклеточного матрикса в регенеративной медицине (Slaughter *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007). Однако, как и в фундаментальной физико-химической биологии, в биотехнологии большое значение имеет четкая качественная и количественная информация о структуре и других физико-химических характеристиках супрамолекулярных систем на основе биологических макромолекул.

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 наночастиц 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, морфологией и физико-химическими свойствами комплексов белков и полисахаридов, а также определение влияния модифицирующих добавок, таких как УНТ, на структуру и свойства биологических систем 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 нерешенные 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 солубилизационные 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 солубилизационной 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 Всероссийской с международным участием школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века (Казань, 2021); Международной юбилейной конференции, посвященной 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.

**Структура и объем диссертационной работы.** 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.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность за ценные советы, неоценимую помощь и всестороннюю поддержку при выполнении научно-квалификационной работы научному руководителю – доктору химических наук, профессору Зуеву Юрию Федоровичу.

Особую благодарность автор выражает профессору кафедры «Физика» ФГБОУ ВО «КГЭУ», к.ф.-м.н. Зуевой Ольге Стефановне за внимание к работе, обсуждении результатов, ценные советы и моральную поддержку.

Автор благодарит с.н.с., к.б.н. Богданову Лилию Рустемовну (лаборатория биофизической химии наносистем КИББ ФИЦ КазНЦ РАН) за помощь в проведении экспериментов, анализе и обсуждении данных; в.н.с., д.х.н. Губайдуллина Айдара Тимергалиевича (лаборатория дифракционных методов исследований ИОФХ ФИЦ КазНЦ РАН) за помощь в проведении рентгеноструктурного анализа; с.н.с., к.т.н. Кадыйрова Айдара Ильдусовича (лаборатория теплофизики и волновых технологий ИЭПТ ФИЦ КазНЦ РАН) за помощь в проведении реологических исследований; в.н.с., д.б.н. Сальникова Вадима Владимировича (кабинет микроскопии КИББ ФИЦ КазНЦ РАН) за помощь в проведении экспериментов по сканирующей электронной микроскопии; с.н.с., к.х.н. Зиганшину Суфию Асхатовну (лаборатория физики и химии поверхности КФТИ ФИЦ КазНЦ РАН) за проведение исследований с помощью атомно-силовой микроскопии; профессора кафедры «Микробиология» К(П)ФУ, д.б.н., проф. Ильинскую Ольгу Николаевну и к.б.н., доцента кафедры «Микробиология» К(П)ФУ Зеленихина Павла Валерьевича за помощь в исследовании цитотоксичности гидрогелевых систем.

Автор искренне признателен всем соавторам своих публикаций. А также выражает благодарность всем сотрудникам лаборатории биофизической химии наносистем КИББ ФИЦ КазНЦ РАН за практическую помощь и поддержку при написании диссертационной работы.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Основные сведения о белке, полисахаридах и их комплексах, используемых в работе

Помимо своих прямых биохимических функций, в живых системах белки и полисахариды участвуют в формировании супрамолекулярных структур, которые обеспечивают специфическую структурно-функциональную нагрузку в организме. 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 формирует в живых системах уникальные комплексы, структурные и физико-химические свойства которых обеспечивают жизнедеятельность организмов.

Фундаментальное понимание межмолекулярных взаимодействий биологических макромолекул и формирования функциональных супрамолекулярных комплексов на их основе являются неотъемлемой частью современной физико-химической биологии.

Белки представляют один из наиболее важных классов биологических макромолекул, задействованных во многих физиологических процессах в организме. Уникальная последовательность, состав и распределение аминокислот - элементарных звеньев белковой макромолекулы, наделяют белок такими специфическими физико-химическими характеристиками, как пространственная структура белка, баланс гидрофобных и гидрофильных свойств его молекул, что определяют его функциональные свойства.

В настоящем исследовании в качестве белковой компоненты изучаемых комплексов использовался желатин. *Желатин* – представляет собой белок, получаемый при термической денатурации фибриллярного белка коллагена, основного компонента соединительной ткани организма - кожи, костей, сухожилий и хрящей (рис. 1.1) (Ramachandran *et al.*, 1967; Echave *et al.*, 2017). Характерной

особенностью аминокислотного состава коллагена является последовательность триад аминокислот, в которых третья аминокислота всегда глицин, вторая — пролин или лизин, а первая — любая другая аминокислота, кроме трёх перечисленных. Около 21 % от общего числа остатков приходится на нестандартные аминокислоты 3-гидроксипролин, 4-гидроксипролин и 5-гидроксилизин.

Эти полипептидные цепи образуют макромолекулу коллагена, которая состоит из трех  $\alpha$ -цепей, закрученных в левостороннюю спираль (тройная спираль коллагена). Один виток каждой цепи содержит три аминокислотных остатка. Такая молекулярная организация является основой структурной стабильности коллагена и уникальных механических свойств образуемых коллагеном фибрилл и волокон (Silva *et al.*, 2014).

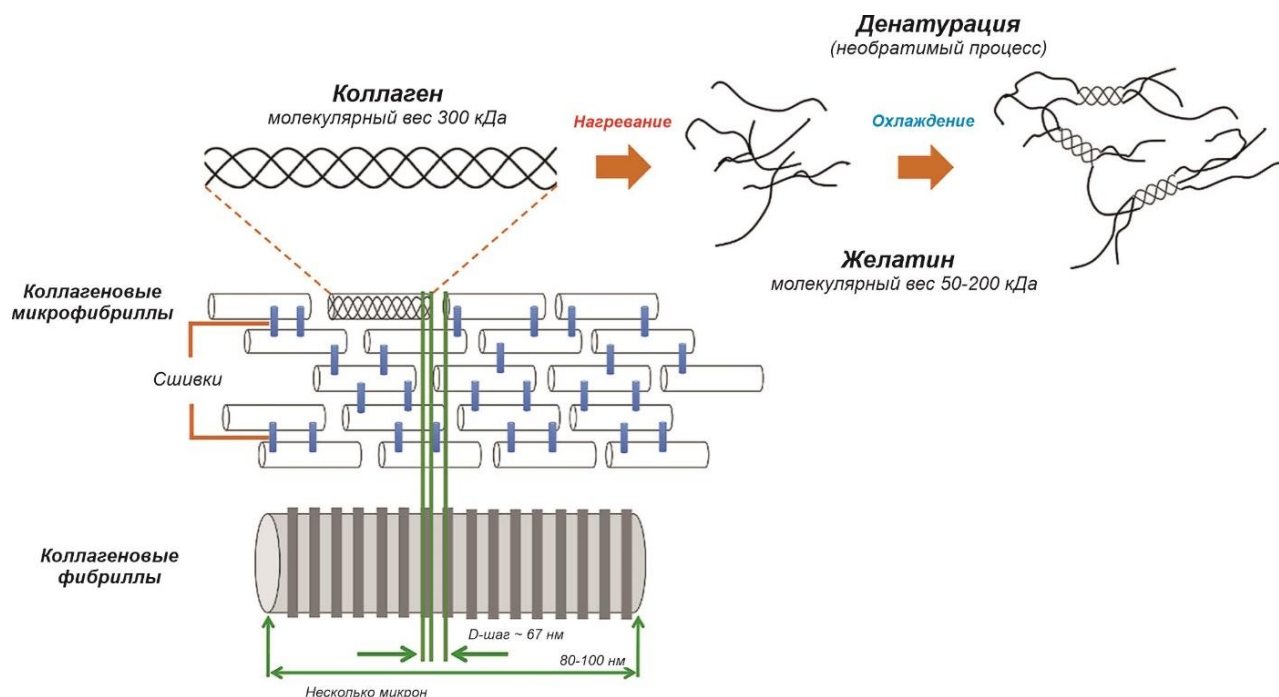


Рисунок 1.1 – Схема процесса денатурации коллагена и образования желатина (Marques *et al.*, 2019).

Желатин получают из коллагена путем разрыва связей между тремя  $\alpha$ -цепями (без гидролиза, т.е. без разрыва пептидных связей в самой  $\alpha$ -цепи). Таким образом, из одной макромолекулы коллагена (ММ=300000) получается 3  $\alpha$ -цепи, т.е. 3

макромолекулы желатина ( $MM=100000$ ). При  $60\text{ }^{\circ}\text{C} > T > 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  желатин имеет конформацию статистического клубка, а при  $T < 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  отдельные участки  $\alpha$ -цепи желатина начинают восстанавливать «тройную коллагеноподобную спираль». Эта тройная коллагеноподобная спираль может быть внутримолекулярной или межмолекулярной. В первом случае три различных сегмента одной  $\alpha$ -цепи спирализуются вместе. Во втором случае три сегмента трех разных молекул желатина спирализуются вместе (Lee *et al.*, 2001).

Различают два типа желатина – тип А (изоэлектрическая точка  $pI = 7-9$ ) и тип В ( $pI = 4.7-5.3$ ), получаемые при кислотной и щелочной обработке соответственно (Lee *et al.*, 2001). При равной с желатином типа В желирующей способности, желатин типа А имеет меньшую вязкость (Jones *et al.*, 2004).

Уникальным свойством желатиновых гелей является их термообратимость. Желатиновый гель представляет собой сетку из полипептидных цепей с зонами сцепления (рис. 1.2). В нагретом растворе желатина тройные спирали находятся в дезорганизованном состоянии, и при охлаждении такого раствора спиральные области восстанавливаются. Общеизвестно, что зоны сцепления (тройные спирали) стабилизируются внутрицепочечными водородными связями, аналогичными обнаруженным в природном коллагене (Sato *et al.*, 1984).



Рисунок 1.2 – Процесс термообратимого гелеобразования желатина (Sato *et al.*, 1984).

Химические свойства желатина существенно зависят от его аминокислотного состава, в частности, содержание аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты/аспарагина, глутаминовой кислоты/глутамина,

гистидина, лизина, гидроксизина и гидроксипролина. Аминокислотный профиль определяет места образование водородных связей. Желатин типа А имеет сходный аминокислотный состав с коллагеном, тогда как желатин типа В не содержат глутамин и аспарагин из-за щелочной обработки (Sato *et al.*, 1984).

При охлаждении до 14°C конформация желатина меняется, а именно увеличивается доля тройных спиралей желатиновых единиц, стабилизированных взаимодействием триад глицин – пролин – оксипролин (рис. 1.3) при формировании стехиометричных полиэлектролитных комплексов (Otterloo *et al.*, 2016).

Тройная коллагеноподобная спираль стабилизируется благодаря Ван-дер-Ваальсовым взаимодействиям между пирролидиновыми кольцами пролина и оксипролина через водородные связи между протоном NH-групп глицина, OH-групп оксипролина и кислородом групп CO.

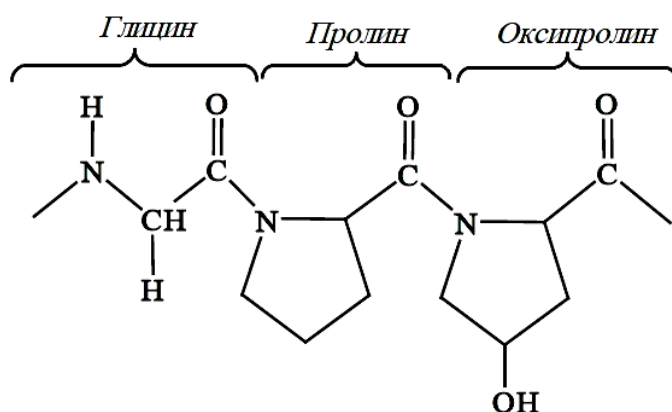


Рисунок 1.3 – Формула трипептида глицин–пролин–оксипролин.

Физико-химические свойства желатина, определяемые его структурными особенностями, влияют на качество его практического применения (Yang *et al.*, 2009). Структурная особенность растворов и гелей желатина исследовалась с помощью методов порошковой рентгеновской дифрактометрии, малоуглового рентгеновского рассеивания (Al-Nimry *et al.*, 2021), сканирующей и атомно-силовой микроскопии (Benmouna *et al.*, 2004), ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье (Cebi *et al.*, 2016). А механические свойства (прочность

геля, вязкость и температура плавления) исследованы с помощью реологического метода (Ahmed *et al.*, 2017).

**Каррагинаны** объединяют семейство полисахаридов, содержащихся в красных морских водорослях *Chondrus Crispis*, *Eucheuma Species*, *Gigartina Species* и др.  $\kappa$ -Каррагинан состоит из чередующихся звеньев  $\beta$ -D-галактозы и 3,6-ангидро- $\alpha$ -D-галактозы, связанных  $\alpha$ -(1,3) и  $\beta$ -(1,4) гликозидными соединениями (рис. 1.4) (Измайлова и др., 1974).

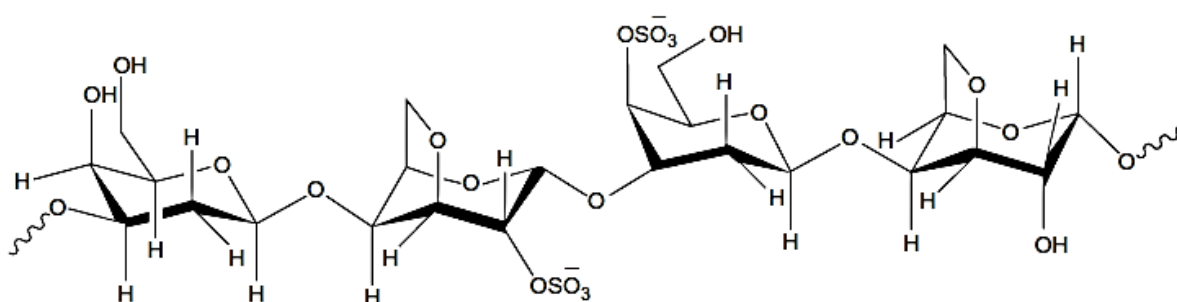


Рисунок 1.4 – Структурная формула  $\kappa$ -каррагинана.

Термообратимое гелеобразование каррагинанов происходит по двухступенчатому механизму, зависящему от температуры и агентов, вызывающих гелеобразование (например ионов). При высоких температурах, выше 75 – 80 °С,  $\kappa$ -каррагинан имеет структуру статистического клубка в результате электростатического отталкивания между соседними полимерными цепями. При охлаждении полимерные цепи меняют конформацию на спиралевидную. Дальнейшее охлаждение и присутствие катионов ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ) приводит к агрегации спиральных димеров и образованию стабильной трехмерной сети, которая формируется за счет межмолекулярных взаимодействий между цепями  $\kappa$ -каррагинана (Gulrez *et al.*, 2011). Для образования  $\kappa$ -каррагинановых гелей катионы, обычно  $K^+$ , стабилизируют зоны соединения между двойными спиральями полисахарида, связывая отрицательно заряженные сульфатные группы и не препятствуя сшиванию двух спиралей.



Авторы (Makshakova *et al.*, 2020) с помощью метода ИК-спектроскопии установили связь между связыванием ионов и переходами вторичной структуры при термообратимом гелеобразовании κ-каррагинана. Спектральный анализ свидетельствует о более прочном катион-сульфатном связывании в системе κ-каррагинан-KCl, чем в системе κ-каррагинан-NaCl. Компьютерное моделирование выявило две энергетически неэквивалентные катион-связанные конформации неокаррабиозного звена (рис. 1.5).

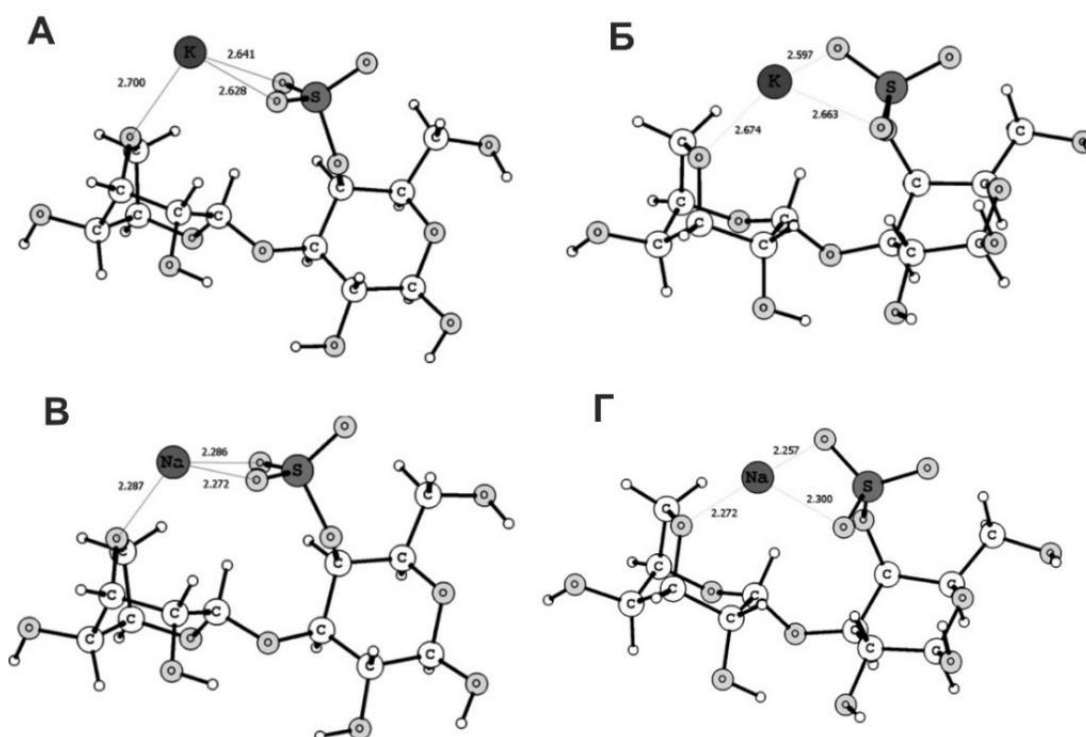


Рисунок 1.5 – Неокаррабиоза со связанным K<sup>+</sup> (А и Б) и Na<sup>+</sup> (В и Г) (Makshakova *et al.*, 2020).

Из них наиболее энергетически выгодная конформация близка к спиральной. Из этих данных следует, что, помимо эффекта экранирования заряда, катион-связанный неокаррабиоза принимает конформацию, благоприятную для образования спирали.

Авторами (Rhein-Knudsen *et al.*, 2015) было проведено сравнение двух различных систем, содержащих KCl и NaCl, которые демонстрируют связывание

ионов и переход от клубка к спирали в агрегированных и неагрегированных условиях, соответственно (рис. 1.6).

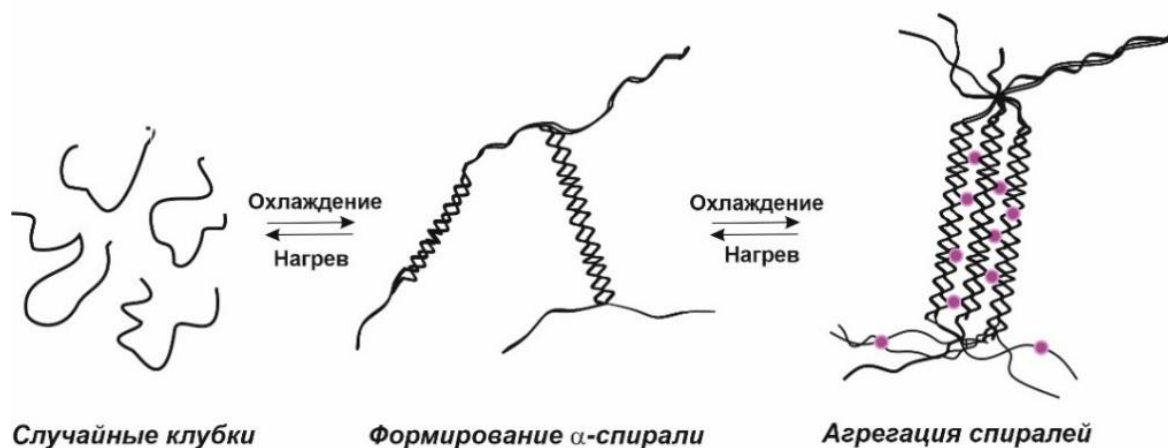


Рисунок 1.6 – Механизм гелеобразования к-каррагинана в присутствии катионов (Rhein-Knudsen *et al.*, 2015).

Согласно этой модели, ионы  $K^+$  действуют аналогичным образом, чтобы сшить две спирали через солевые мостики. Заряженные сложноэфирные сульфатные группы на другой стороне мономера  $\iota$ -каррагинана стимулируют образование объемной конформации за счет эффекта отталкивания отрицательных групп  $SO_3^-$  и ингибируют гелеобразование, одновременно повышая вязкость раствора (Montero *et al.*, 2002). Таким образом, различия в положении сульфатов, их пропорции и наличие ангидридных мостиков придают каррагинанам характерные гелевые свойства: к-каррагинан образует прочные и «жесткие» гели,  $\iota$ -каррагинан, образует «мягкие» гели, и  $\lambda$ -каррагинан, который не образует гель, но обеспечивает повышенную вязкость раствора из-за структуры, не допускающей образования спирали.

Гидрогели на основе к-каррагинана часто применяются в системах доставки лекарственных средств для приготовления однокомпонентных и смешанных гидрогелей с агаром и желатином. Добавление к-каррагинана улучшает прочность желатинового геля (Bromberg *et al.*, 1998).

**Альгинат натрия** – полисахарид, извлекаемый из бурых водорослей *Phaeophyceae* (ламинария японская). Альгинат натрия представляет собой линейный неразветвленный блок-сополимер (1-4)-связанных D-маннуронат (M) и L-гулуронат (G) мономеров, которые организованы в блоки (т.е. содержат последовательности  $(M)_m$ ,  $(G)_n$  и  $(M, G)_x$  вдоль полимерной цепи (рис. 1.7)). Наиболее важным свойством, обусловленным блочной структурой альгината, является способность образовывать гели. Основным преимуществом альгината в качестве гелеобразователя является его способность образовывать термостойкие гели при комнатной температуре в присутствии двухвалентных катионов, особенно  $Ca^{2+}$  (Draget *et al.*, 2001).

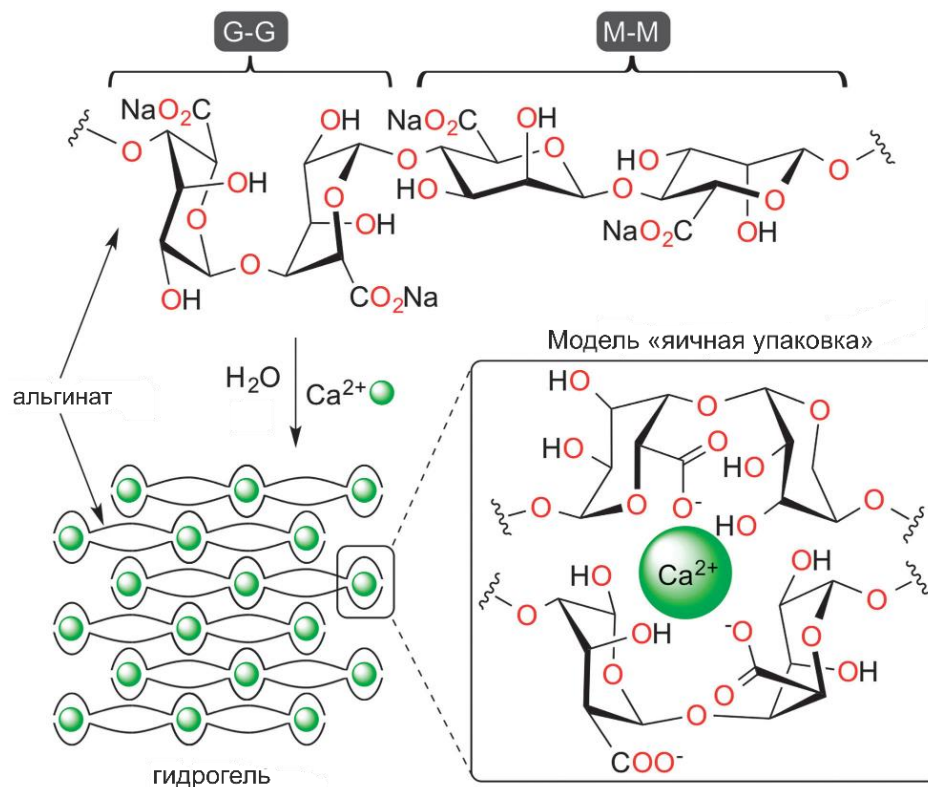


Рисунок 1.7 – Структура повторяющихся единиц альгината натрия и формирование гидрогеля путем координирования катионами  $Ca^{2+}$  соседних альгинатных цепей по принципу модели «яичной упаковки» (Kühbeck *et al.*, 2015).

Чтобы взаимодействовать с  $Ca^{2+}$  для образования геля, альгинат должен содержать определенную долю гулурановой кислоты, а мономеры гулурановой кислоты должны располагаться блоками. Зона соединения гелевой сетки альгината

образуется, когда G–блок одной молекулы альгината физически связан с G–блоком другой молекулы полисахарида через взаимодействия с  $Ca^{2+}$  – модель «яичной упаковки» (рис. 1.7) (Choi *et al.*, 2002).

Механическую прочность гидрогелей можно регулировать с помощью соотношения мономеров в полимерной цепи, что позволяет легко создавать различные структурные формы (бусины, трубки, мембраны) (Kühbeck *et al.*, 2015).

Белки играют важную роль в формировании и стабилизации комплексов с полисахаридами, взаимодействуя через водородные связи, электростатические, ионные и гидрофобные взаимодействия. С другой стороны, полисахариды, будучи гидрофильными по своей природе, обычно остаются в водной фазе, что помогает контролировать их реологические свойства, например, загущать, желировать или действовать как стабилизирующие агенты. Взаимодействие белков и полисахаридов в водной среде в зависимости от условий (рН, температуры, молекулярной массы, степени ионизации, ионной силы и плотности заряда биополимеров) может проходить с образованием полиэлектролитных комплексов (ПЭК) (Berger *et al.*, 2004). ПЭК образуются при смешении двух биополимеров противоположного заряда, образуя комплекс, в котором макромолекулы связаны друг с другом в основном за счет электростатических взаимодействий (Hess *et al.*, 2006).

Белок-полисахаридные ПЭК в основном сфероидальные и состоят из нейтрального ядра, содержащего стехиометрическую смесь катионных и анионных биополимеров, окруженного избытком одного из полиэлектролитов, что позволяет сформировать заряженную стабилизирующую оболочку (Buschmann *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016) (рис. 1.8).



Рисунок 1.8 – Схема образования ПЭК (Serrano-Sevilla *et al.*, 2019).

При смешивании двух биополимеров в водной среде могут возникать два различных типа взаимодействий, в основном в зависимости от pH и ионной силы (рис. 1.9): сегрегативное разделение фаз (термодинамическая несовместимость) и ассоциативное фазовое разделение (термодинамическая совместимость) (Kabir *et al.*, 2018; Slaughter *et al.*, 2009). Разделение фаз происходит, когда один или оба биополимера не заряжены или оба биополимера имеют одноименный заряд. Однофазный раствор образуется при достаточно низких концентрациях биополимера, тогда как двухфазный раствор, содержащий отдельные фазы белка и полисахарида, образуется, когда концентрация биополимера превышает определенный уровень (Jones *et al.*, 2004; Distantina *et al.*, 2013). Напротив, ассоциативное разделение фаз вызывается относительно сильным притяжением между двумя биополимерами. Установлено, что такие взаимодействия носят преимущественно электростатический характер и подавляются при более высокой концентрации ионов. Полученная двухфазная система состоит из фаз, насыщенных растворителем, и фаз, насыщенных биополимером.

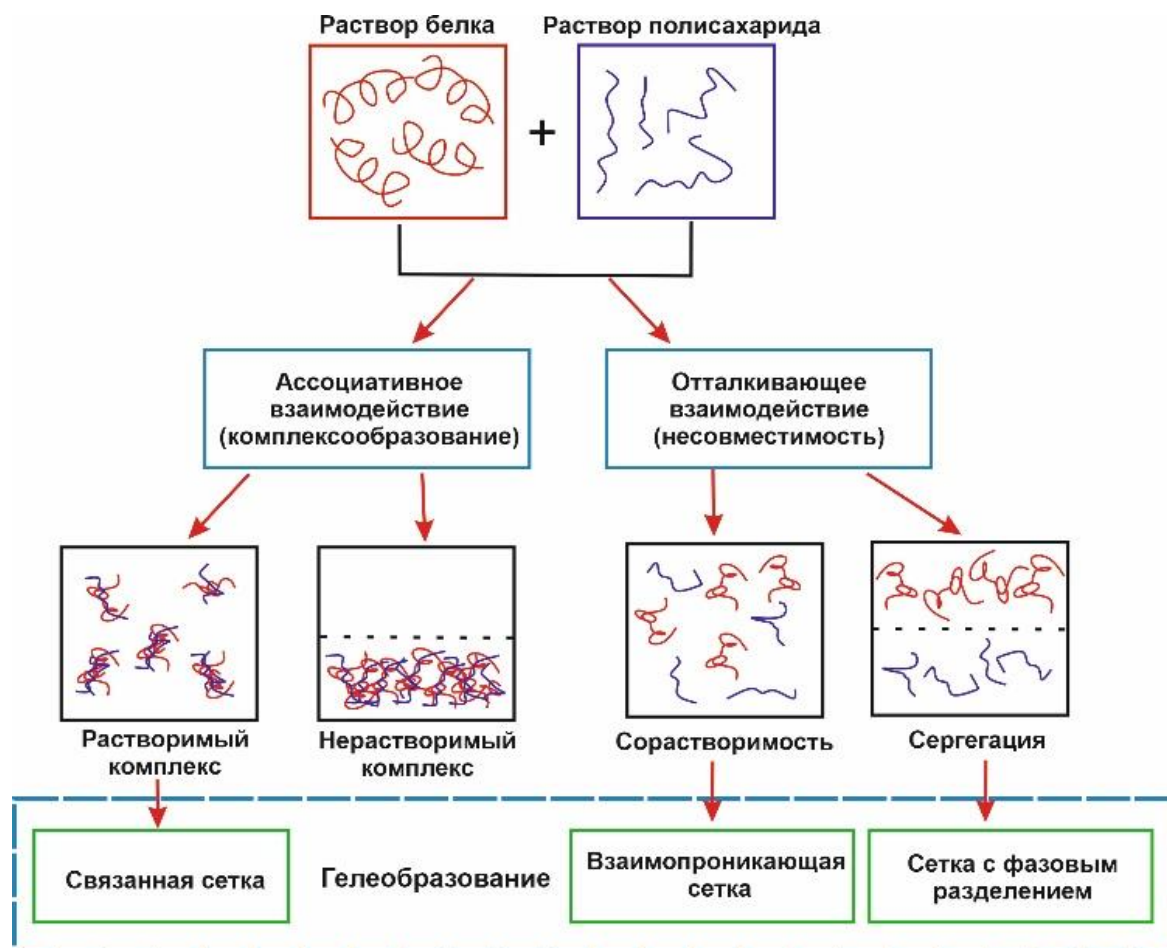


Рисунок 1.9 – Возможные типы взаимодействия в смесях белок-полисахарид и следствия образования смешанных гелей (Ghosh *et al.*, 2012).

Фаза, насыщенная биополимером, может образовывать либо коацерваты, либо осадки (нерастворимые комплексы). Коацерваты образуются путем разделения фаз жидкость-жидкость, тогда как осадки образуются разделением фаз твердое тело-жидкость. Две структуры следуют одной и той же последовательности, то есть два биополимера образуют первичные растворимые комплексы при критическом pH ( $pH_c$ ), затем образуются смешанные комплексы, когда pH снижается до второго критического значения ( $pH_\phi$ ), и, наконец, формируется объемная фаза (Turgeon *et al.*, 2009). Однако до сих пор не ясно, почему некоторые белок-полисахаридные системы приводят к преципитации, а другие к коацерватам, но это может быть связано с гибкостью и плотностью заряда молекул (Turgeon *et al.*, 2009).

Белки или полисахариды с низкой плотностью заряда и/или очень гибкой основной цепью склонны к образованию коацерватов, например, желатин, арабийская камедь, сульфат декстрана; тогда как полисахариды с высокой плотностью заряда и с жесткой структурой склонны к образованию комплексов, например, ι- и κ-каррагинан, альгинат натрия и ксантановая камедь. Кроме того, более высокая аффинность молекулярного связывания также способствует образованию комплексов. Другие слабые взаимодействия, такие как водородные связи и гидрофобные взаимодействия, также могут влиять на комплексообразование между белками и полисахаридами (Turgeon *et al.*, 2007). Комплексообразование белков и полисахаридов также возможно, когда они несут одинаковые суммарные заряды при рН, близком к изоэлектрической точке белка, если имеются противоположно заряженные участки на белке (Turgeon *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2007).

## **1.2 Основные сведения о белок-полисахаридных гидрогелях**

В последние пару десятилетий большой интерес к природному взаимодействию и комплексообразованию белков и полисахаридов многократно усилился в связи с выяснением их огромного потенциала для инженерии искусственных биоподобных структур на основе биосовместимых и биоразлагаемых природных макромолекул (Dave *et al.*, 2018; Simson *et al.*, 2015), которые позволяют конструировать функциональные материалы медико-биологического назначения для создания систем здорового питания, пролонгированного высвобождения фармакологических препаратов, культивирования клеток и сенсоров (Bardajee *et al.*, 2010; Safavi-Mirmahalleh *et al.*, 2019). Одной из таких самых распространенных систем, во многом по структуре и свойствам копирующей внутри- и межклеточный матрикс живых систем, являются гидрогели – «сшитые» химически или физически пространственные биополимерные сети, содержащих в своем объеме большое количество воды.

Интерес ученых к белок-полисахаридным гидрогелям лавинообразно растет, как к моделям для исследования различных процессов в водной среде живых систем (Chirani *et al.*, 2015; Le *et al.*, 2017), у биотехнологов и врачей, как к «умному» материалу для использования в регенеративной медицине и фармацевтике (Suntornnond *et al.*, 2016; Balakrishnan *et al.*, 2011). Этот интерес можно оценить, проанализировав количество статей по данной теме на *PubMed*, показывающее экспоненциальный рост публикаций за последние 30 лет (рис. 1.10).

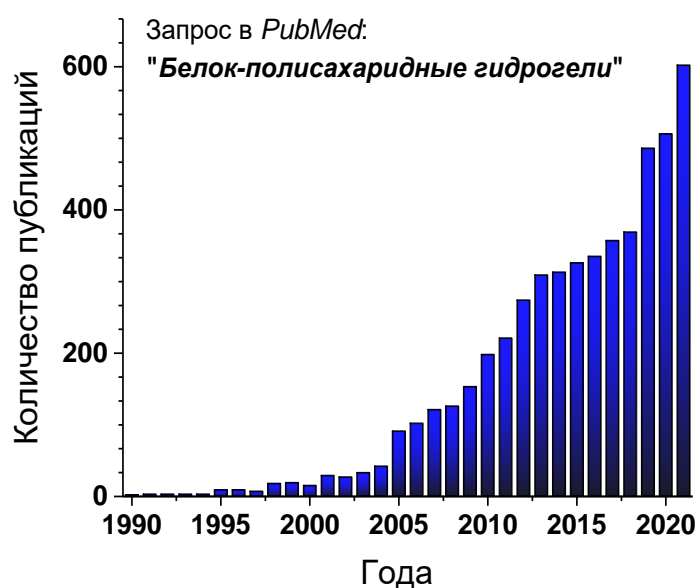


Рисунок 1.10 – Количество публикаций по теме «Белок-полисахаридные гидрогели» за последние 30 лет.

Гидрогели представляют собой структурированные системы на основе гидрофильных макромолекул, способных обратимо набухать в воде и в водных растворах. Наличие трёхмерного полимерного каркаса (сетки) обеспечивает гидрогелям такие механические свойства твёрдых тел, как отсутствие текучести, способность сохранять форму, прочность, пластичность и упругость (Gong *et al.*, 2006).

Различают физически и химически сшитые гидрогели (рис. 1.11). В отличие от «химических» гидрогелей с ковалентными связями между полимерными цепями, в «физических» гидрогелях поддержание трёхмерной структуры



обеспечивается водородными связями, ионные, гидрофобными и электростатическими взаимодействиями (Maitra *et al.*, 2014).

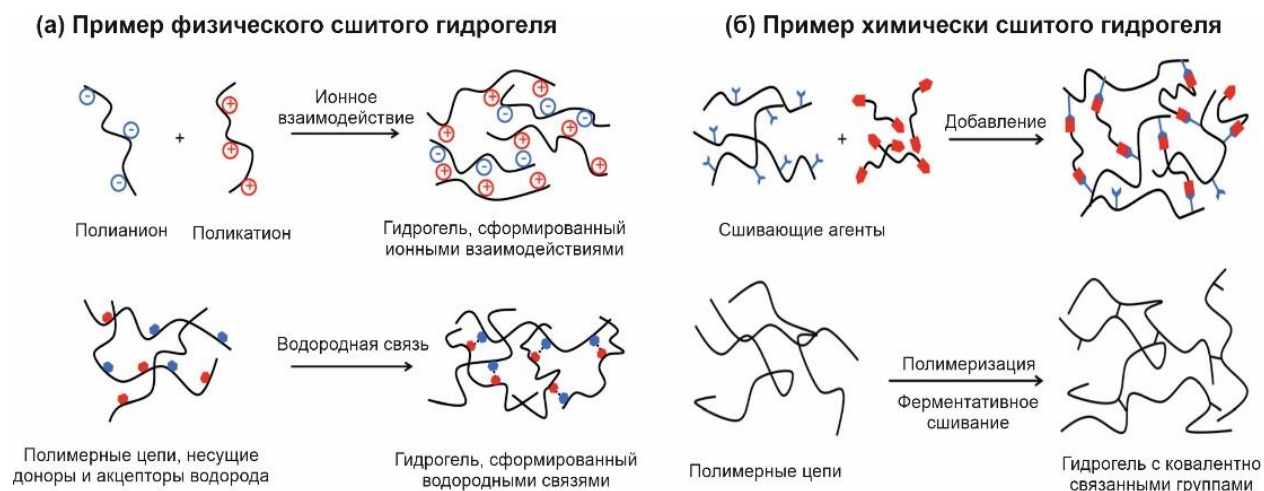


Рисунок 1.11 – Примеры физически и химически сшитых гидрогелей (Ghobril *et al.*, 2015).

Гидрогели являются универсальными, широко изученными, активно используемыми и важными материалами. Тем не менее, существует множество проблем, которые необходимо решить, чтобы обеспечить полное понимание структурообразования и свойств этих материалов и облегчить разработку их новых приложений в исследованиях проблем физико-химической биологии и конструировании биотехнологических комбинаций, начиная от их механической устойчивости, проницаемости для воды и физиологически-активных соединений, тканевой инженерии, сбора/накопления/транспорта энергии и аддитивных технологий.

Структура и свойства используемых биополимеров определяет топологию образуемой ими полимерной сети, т.е. геометрию распределения точек контактов в объеме полимерной сети. Учитывая, что многие свойства полимерных сетей (например, эластичность, пористость и набухаемость) имеют топологическое происхождение, растет интерес к пониманию и контролю морфологии сетей с молекулярной точки зрения. Подавляющее большинство полимерных сетей являются аморфными или полукристаллическими (т.е. имеют аморфные и

кристаллические домены) и, таким образом, богаты топологическими особенностями, которые охватывают несколько размерных масштабов, от молекулярного до субмикронного. На рисунке 1.12 показаны эти особенности для аморфных сетей.

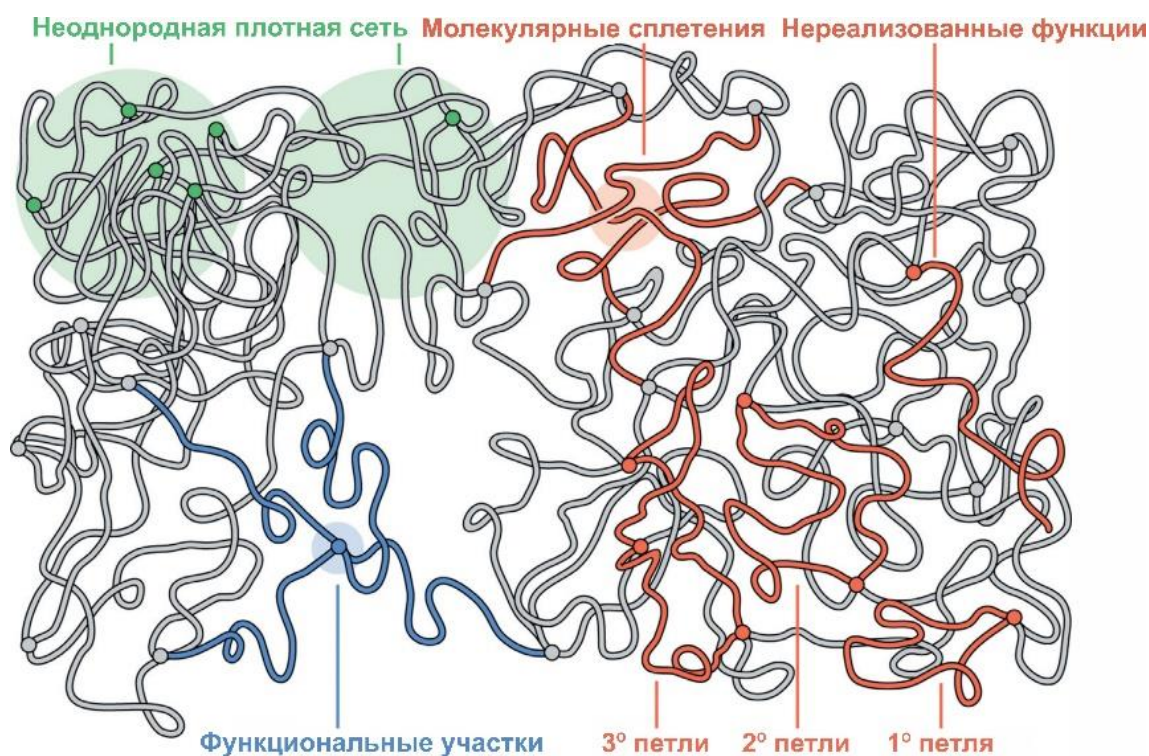


Рисунок 1.12 – Гетерогенность топологии полимерных сетей на разных размерных масштабах. Топологические особенности аморфных полимерных сетей делятся на три различных масштаба: 10-100 нм (показано зеленым), 1-10 нм (показано красным) и <1 нм (показано синим) (Yuwei *et al.*, 2020).

В диапазоне 10-100 нм топология полимерной сети характеризуется неоднородностью плотности соединений (рис. 1.12), что является результатом флуктуаций полимерных цепей во время формирования сети (Bastide *et al.*, 1988). Метод малоуглового рентгеновского рассеяния дает количественную информацию на этом размерном масштабе (Shibayama, 2011; Lorenzo *et al.*, 2015). Спутанные, невзаимодействующие цепи, переплетения и петли различного порядка составляют макромолекулярные особенности полимерной сетки, которые доминируют в масштабе 1-10 нм (Yuwei *et al.*, 2020). На молекулярном уровне особенности сетки

в основном диктуются химической структурой полимерной цепи и межмолекулярным взаимодействием между цепями, а не топологией; химическое строение цепи является критической особенностью молекулярного масштаба сетки, которая диктует топологию сети и свойства сформированных систем (рис. 1.12).

Белки и полисахариды могут образовывать различные сетевые гелевые структуры: взаимопроникающие, связанные и разделенные по фазам сети (Stokes *et al.*, 2012), как показано на рисунке 1.13.

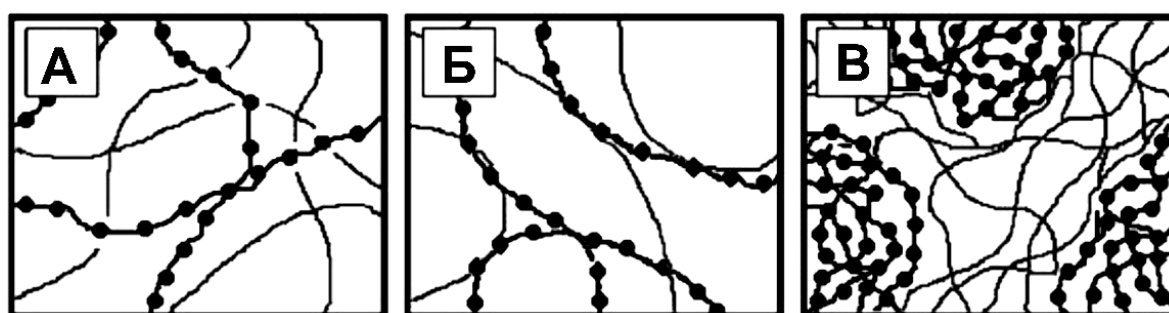


Рисунок 1.13 – Сетевые структуры гелей: (А) взаимопроникающие сети; (Б) связанные сети и (В) сети с фазовым разделением (Norton *et al.*, 2014).

Взаимопроникающие сети включают два полимера, которые «спутаны» только физически (рис. 1.13А). Эта система не предполагает химических взаимодействий между двумя полимерами (Kasapis *et al.*, 1993). Примером являются смеси альгината кальция и желатина, но только в том случае, если желатиновые спирали образуются внутри уже существующего альгинатного геля (Panouillé *et al.*, 2009).

В случае связанных сетей существуют взаимодействия между двумя полимерами, которые способствуют образованию единой сети (рис. 1.13Б). Оптимальные уровни для связанной сети связаны с количеством зон соединения на каждой полимерной цепи. Связанная сеть также может представлять собой связывание двух отдельных полимерных цепей посредством ассоциации аниона с катионом или посредством ковалентной связи (Kasapis *et al.*, 1993). Процесс

гелеобразования первоначально идет по пути, аналогичному образованию комплексов и коацерватов, затем взаимодействуют растворенные комплексы, приводя к сетчатой структуре вместо укрупнения комплексов и фазового разделения системы (Laneuville *et al.*, 2006). Связанные сети гелей могут быть образованы многими белково-полисахаридными системами на основе желатина, бычьего сывороточного альбумина, лизоцима, альгината натрия, каррагинана и др. (Ballester *et al.*, 2005).

Гели с разделенными фазами (рис. 1.13В) включают полимерную матрицу, в которой полимеры не взаимодействуют друг с другом. Вместо этого в такой системе один из полимеров обычно образует непрерывную сеть, и, следовательно, доминирующую фазу, а второй полимер используется в качестве включенной фазы или фазы «наполнителя» (Norton *et al.*, 2004).

Информация об известных исследованиях некоторых белок-полисахаридных гелей приведена в таблице 1.1.

Таблица 1.1– Опубликованные исследования о белок-полисахаридных гидрогелях

<b>Модельная система</b>	<b>Условия эксперимента</b>
β- лактоглобулин - κ- каррагинан	1. $c_{бел} = 0.5, 5, 10 \%$ ; $c_{nc} = 1 \%$ ; pH = 7.0 (Eleya <i>et al.</i> , 2000) 2. $c_{бел} = 10 \%$ ; $c_{nc} = 1 \%$ ; pH = 5.0, 6.0, 7.0 (Eleya <i>et al.</i> , 2000)
β- лактоглобулин /низко- и высокометоксилированный пектин – альгинат натрия	1. $c_{бел}/c_{nc} = 2, 5, 10$ с общей концентрацией = 0.1 %, 0.2 % и 0.3 %; pH = 4.4 (Le <i>et al.</i> , 2015) 2. $c_{бел}/c_{nc} = 2, 5, 15, 20$ с общей концентрацией = 0.1 %; pH ≈ 4.5 (Laneuville <i>et al.</i> , 2006) 3. $c_{бел}/c_{nc} = 2, 5, 10, 20$ ; 1) с общей концентрацией = 0.3 %, 2) $c_{бел} = 0.03 \%$ , 3) $c_{nc} = 0.3 \%$ ; pH = 4.4 (Le <i>et al.</i> , 2013)
κ-каррагинан-желатин	1. $c_{бел} = 1.0 \%$ ; $c_{nc} = 0.001-0.5\%$ ; pH = 5.2-5.6 (Derkach <i>et al.</i> , 2014) 2. $c_{бел} = 1-2\%$ ; $c_{nc} = 0.05-1 \%$ (Derkach <i>et al.</i> , 2015)
глюкоманнан-желатин	$c_{бел} = 4 \%$ ; $c_{nc} = 0.1-0.5 \%$ (Jin <i>et al.</i> , 2015)
κ-каррагинан-изолят сывороточного протеина	1. $c_{бел} = 13 \%$ ; $c_{nc} = 0-0.6 \%$ ; pH = 7.0, 50, 100, 250 mM NaCl (Çakır <i>et al.</i> , 2011) 2. $c_{бел} = 5 \%$ ; $c_{nc} = 0-0.3 \%$ ; pH = 5.5, 6.0, 6.5; 100 mM NaCl (Çakır <i>et al.</i> , 2012)
ι-каррагинан-желатин	$c_{бел} = 8 \%$ ; $c_{nc} = 2 \%$ ; pH = 7; 0.2 M NaCl (Michon <i>et al.</i> , 1996)

Продолжение таблицы 1.1 – Опубликованные исследования о белок-полисахаридных гидрогелях

альгинат-желатин	1. $c_{бел} = 1-2 \%$ ; $c_{пс} = 1-1.5 \%$ ; ЭДТА 180 мМ, D-глюкано-d-лактон 180 мМ (Panouillé <i>et al.</i> , 2009) 2. $c_{бел} = 1.5, 5 \%$ ; $c_{пс} = 1 \%$ ; с ЭДТА и альгинатной лиазой (Doumèche <i>et al.</i> , 2007)
------------------	---

Примечание:  $c_{бел}$  – концентрация белка;  $c_{пс}$  – концентрация полисахарида

### 1.3 Структура и свойства белок-полисахаридных гелей. Экспериментальные методы изучения и медицинские приложения

Свойства гидрогелей по большей части зависят от их перекрестно-сшитой структуры. Степень сшивания определяется средней молекулярной массой полимерной цепи между сшивками. Плотность поперечных сшивок напрямую влияет на другие свойства гидрогелей, такие как степень набухания, механическая прочность, эластичность, пористость и диффузия низко- и высокомолекулярных веществ (Le *et al.*, 2017). Эти свойства, которые могут быть определены экспериментально или теоретически, способствуют пониманию взаимосвязи структуры и функциональных характеристик гидрогелей (Makshakova *et al.*, 2022).

Широкий спектр методов используется для характеристики структурно-топологических особенностей биополимерных сетей в гидрогелях. Одними из наиболее прямых и информативных структурных методов являются методы рентгеновской дифракции. Были получены и проанализированы рентгенодифракционные картины хитозана, желатина и композитных пленок, которые выявили заметные различия в их структуре (Agarwal *et al.*, 2016). Дифракционная картина хитозана демонстрировала отчетливые кристаллические пики, расположенные на уровне  $2\theta$  при  $10^\circ$  и  $20^\circ$ , в то время как рентгенограмма желатина демонстрировала большую аморфность с характерным широким гало в диапазоне  $2\theta = 15-30^\circ$ . Кристаллические пики хитозана исчезают при формировании композиции между хитозаном и желатином. Желатин демонстрирует широкий кристаллический пик порошковой рентгеновской дифракции при  $2\theta = 20.9^\circ$ , обусловленный трехспиральной кристаллической

структурой коллагена (Pěna *et al.*, 2010). Кристаллическая природа к-каррагинана показана при широкой полосе и незначительном пике при  $2\theta$  около  $20^\circ$  и  $28^\circ$  (Rhim *et al.*, 2013).

Структура гидрогелей изучалась с помощью метода малоуглового рентгеновского рассеивания (МУРР). Для водного раствора желатина 6 мас. % был определен радиус инерции  $R_g = 112 \text{ \AA}$  (Helminger *et al.*, 2014). Для водного раствора желатина 3.75 мас. % при температурах  $20^\circ\text{C}$  и  $37^\circ\text{C}$  были получены значения радиуса инерции полимерных агрегатов  $R_g$  равные  $114 \text{ \AA}$  и  $108 \text{ \AA}$  соответственно (Gelli *et al.*, 2017). В состоянии золя средний радиус компактных клубков желатина оценивается как  $R_g = 150\text{-}280 \text{ \AA}$  (Levachev *et al.*, 2004; Bohidar *et al.*, 1998). Гелеобразование желатина при понижении температуры сопровождается конформационным переходом клубок  $\rightarrow$  спираль, при котором полипептидные цепи желатина приобретают упорядоченную конформацию, сворачиваясь в тройную коллагеноподобную спираль. Длина спирали порядка  $220\text{-}300 \text{ \AA}$ , а ее толщина –  $14\text{-}15 \text{ \AA}$  (Levachev *et al.*, 2004).

Результаты МУРР для гидрогелей 1 мас. % к-каррагинана были описаны с помощью модели Гаусса-Лоренца гель со значением параметров  $\Xi \sim 80\text{-}100 \text{ \AA}$  (характерным средним размером статических неоднородностей) и  $\xi \sim 30\text{-}40 \text{ \AA}$  (корреляционная длина для полимерных цепей, связанная с взаимодействием между флуктуирующими цепями полимера) (Evmenenko *et al.*, 2001). Авторы (Evmenenko *et al.*, 2001) по данным рентгеновского дифракционного исследования установили, что макромолекула к-каррагинана 2 мас. % имела жесткую цилиндрическую структуру, а радиус поперечного сечения ( $R_c$ ) был намного меньше длины ( $L$ ) со значениями  $R_c = 11.8 \pm 0.03 \text{ \AA}$ , а  $L = 174 \text{ \AA}$ .

Измерение фрактальной размерности полимерной цепи ( $d_f$ ) с помощью МУРР позволило проследить эволюцию внутренней структуры возникающих комплексов (рис. 1.14) (Girard *et al.*, 2004). Значение  $d_f$  указывает на степень компактности структуры: если частицы агрегируют в линейные супрамолекулярные структуры, то значение  $d_f$  стремится к 1; если они образуют компактные сферические агрегаты, то  $d_f$  стремится к 3 (Bushell *et al.*, 2002).

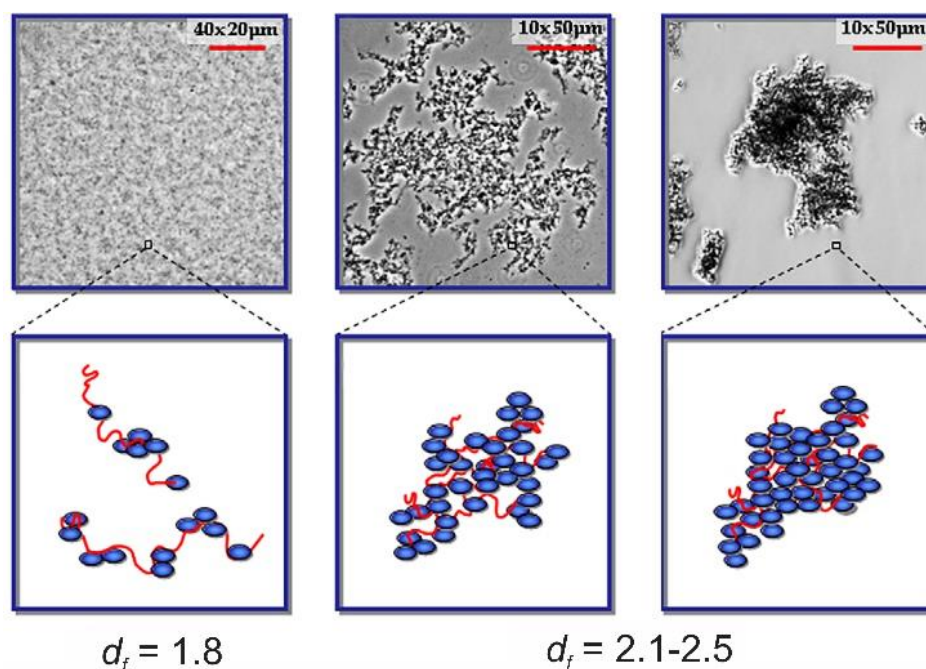


Рисунок 1.14 – Схематичное изображение фрактальной размерности ( $d_f$ ) полимерной сетки (Turgeon *et al.*, 2009).

Изменения в структуре желатина при образовании комплексов с полисахаридом были подтверждены с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Изображение СЭМ подтверждает надмолекулярную структуру нативного желатина, образованную тройными коллагеноподобными спиральями. Полисахаридные добавки вызывают существенные изменения в сетевой структуре белка.  $\kappa$ -Каррагинан инициирует взаимодействия между трехспиральными зонами в желатине за счет образования ПЭК (Derkach *et al.*, 2018). В некоторых случаях (в присутствии альгината натрия) это может привести к образованию сложных агрегатов (Peak *et al.*, 2013; Xuan *et al.*, 2017). Для  $\kappa$ -каррагинана по данным СЭМ существует взаимосвязанная и пористая структура с относительно большим пустотами между ними (Yang *et al.*, 2018).

Сочетание желатина с анионным полисахаридом в качестве со-гелеобразователя является эффективным способом модификации физико-химических свойств желатиновых гелей, включая прочность и температуру плавления. В последнее время материалы, в частности гидрогели, демонстрируют

резкие изменения свойств в ответ на внешние факторы (Higuchi *et al.*, 2014), которые привлекают значительное внимание в связи с их широким спектром потенциальных применений в биоматериалах, сенсорах, дисплеях и т.д. (Jones *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2011).

Физико-химические свойства композиционных к-каррагинан-желатиновых гелей и их изменения были подтверждены анализом структуры ПЭК при взаимодействии компонент (Derkach *et al.*, 2018). При низких соотношениях между полисахаридом и белком ( $Z < 0.1$ ) физико-химические свойства смешанных гелей изменяются незначительно, а при увеличении содержания полисахарида ( $Z > 0.1$ ) температура плавления и прочность геля резко возрастают. Предполагается, что причиной упрочнения смешанного геля является образование дополнительных соединений между цепями биополимеров, приводящих к образованию стопок из тройных спиралей желатина, взаимодействующих с двойными спиральями к-каррагинана

Взаимодействие между белками и полисахаридами значительно влияет на реологическое поведение конечного продукта (Grinberg *et al.*, 1997). Взаимодействию белка и полисахарида уделяется большое внимание, так как оно может привести к улучшению функциональных свойств (стабильность, межфазные и гелеобразующие свойства, инкапсуляция) по сравнению с индивидуальными компонентами.

Реология широко используется для наблюдений золь-гель переходов, механических свойств гидрогелей и понимания молекулярных и структурных особенностей, способствующих образованию геля. Осцилляторная реология с малой амплитудой колебаний позволяет определить вязкоупругий отклик гелей на динамическое напряжение сдвига. Такое тестирование позволяет проводить многочисленные измерения без разрушения образца из-за небольших деформаций. Так, в работе (Derkach *et al.*, 2015) приведены результаты исследования вязкоупругих свойств к-каррагинан-желатинового геля. Было показано, что значение модуля упругости  $G''$  превышает значения модуля потерь  $G'$ , что характеризует твердоподобное поведение образца, а низкое значение тангенса угла потерь



свидетельствует об образовании физического геля как в желатине, так и в смесях к-каррагинан-желатин. Увеличение концентрации полисахарида по отношению к желатину приводит к увеличению модуля упругости  $G''$ . Более того, при рассмотрении модифицированного геля, образованного ПЭК, можно обнаружить наличие синергетического эффекта в формировании гелевой сети.

Для водных растворов желатина снижение температуры приводит к переходу золь-гель при концентрации выше определенного порога. Эта критическая концентрация для рыбного желатина составляет 10 мас. % и переход происходит при температуре ниже  $10^{\circ}\text{C}$  (Kołodziejaska *et al.*, 2008), в то время как критическая концентрация для желатина млекопитающих близка к 1 мас. % при температуре  $15^{\circ}\text{C}$  (Huang *et al.*, 2019).

Было проведено систематическое исследование реологических свойств гелей, образованных ПЭК, включающими рыбий желатин и альгинат в широком диапазоне массовых соотношений (Derkach *et al.*, 2020). Результаты показали, что переход золь-гель является кинетическим процессом, хотя образование геля происходит относительно быстро при низких температурах. Максимальная температура золь-гель перехода и максимальные значения модуля упругости и вязкости (вязкоупругих параметров) комплексных гелей наблюдались при характерном массовом отношении альгината к рыбьему желатину  $Z^* = 0.06$  (0.07), и это отношение количественно коррелирует с концентрацией ионных групп в комплексах. Гомогенная структура систем, образованных стехиометрическими альгинат-желатиновыми комплексами при  $Z < Z^*$ , характеризуется увеличением модуля упругости с ростом концентрации полисахарида. Напротив, неоднородные структуры, образованные водорастворимыми нестехиометрическими комплексами переменного состава при  $Z > Z^*$ , вызывают снижение вязкоупругих характеристик гелей с увеличением концентрации полисахарида. Измерение вязкоупругих свойств при различных частотах и поведение при восстановлении текучести позволило классифицировать исследуемые объекты как вязкопластичные вещества (Derkach *et al.*, 2020).

Изучению изменения макромолекулярной структуры желатина при взаимодействии с полисахаридом с использованием различных экспериментальных

методов посвящено множество работ. Широко используется метод инфракрасной Фурье-спектроскопии, позволяющий характеризовать структурные изменения макромолекул биополимеров при их взаимодействии (Derkach *et al.*, 2018). Спектры смешанных гелей к-каррагинан-желатин выявили две области с доминирующим поглощением одного из компонентов геля. Поглощение белков приводит к появлению двух интенсивных спектральных полос: Амид I ( $1700-1600\text{ см}^{-1}$ ) и Амид II ( $1600-1500\text{ см}^{-1}$ ), которые чувствительны к конформации. С помощью молекулярного докинга была установлена атомная структура зон соединения (Derkach *et al.*, 2018) (рис. 1.15).

Количество ионных связей между полимерными цепями определяет взаимную ориентацию двойных и тройных спиралей. При наличии отдельных контактов, которые распределены вдоль цепи, стержни спиралей стремятся иметь параллельную ориентацию, что приводит к образованию наиболее энергетически выгодных узлов среди этой группы соединений (рис. Д). Комплементарность тройной спирали желатина и двойной спирали к-каррагинана создает возможность образования узла из одной тройной спирали желатина и до трех двойных спиралей к-каррагинана. Более того, одна к-каррагинановая двойная спираль может принимать до трех желатиновых тройных спиралей. При моделировании сетевых соединений к-каррагинан-желатиновый гель показывает, что взаимодействие одной цепи к-каррагинана с тройной спиралью желатина является более благоприятным по сравнению с парными взаимодействиями двойных и тройных спиралей. Благодаря своей гибкости, одиночная полисахаридная цепь может образовывать большое количество Ван-дер-ваальсовых и ионных контактов с молекулами желатина. Стержнеподобная двойная спираль к-каррагинана образует довольно ограниченное число контактов, которые стабилизируются в основном электростатическими взаимодействиями.

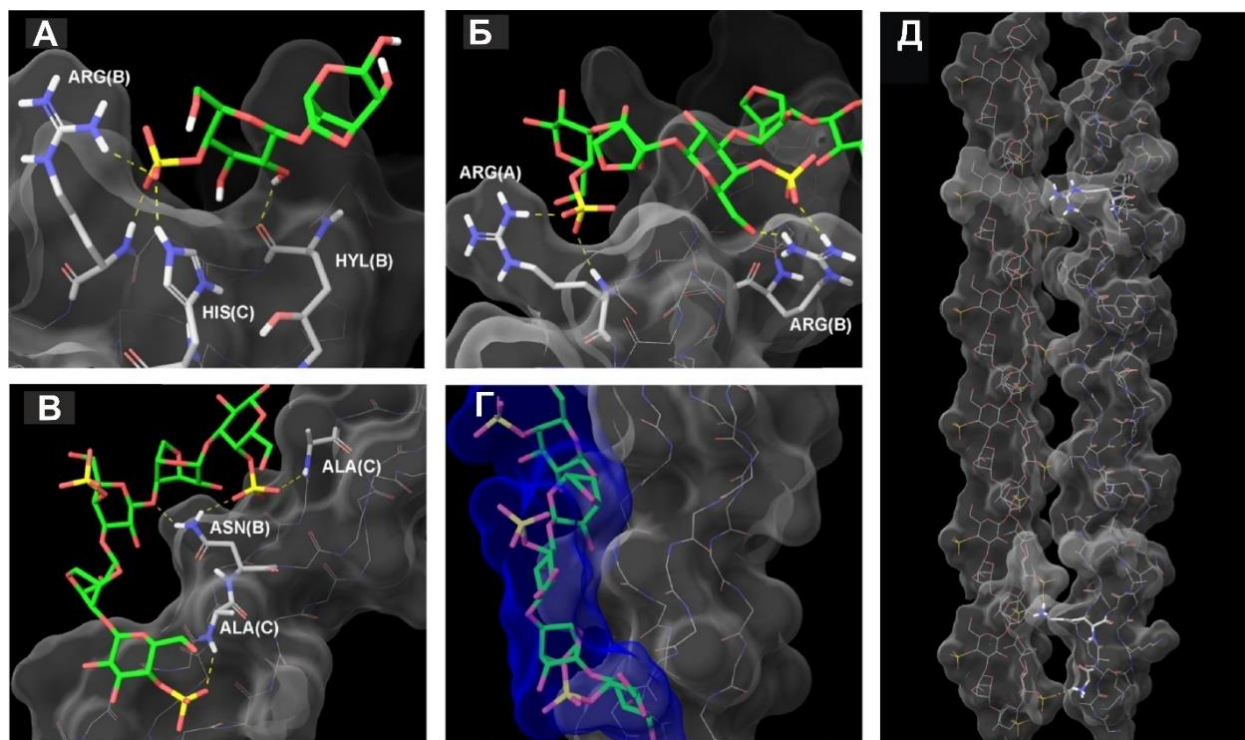


Рисунок 1.15 – (А) Взаимодействие каррабиозной единицы к-каррагинана с тройной спиралью желатина; (Б, В, Г) контакты олигосахаридного фрагмента к-каррагинана с тройной спиралью желатина; (Д) наиболее благоприятные зоны соединения тройной спирали желатина с двойной спиралью к-каррагинана, образующиеся в модифицированных гелях. Молекулярная поверхность показана прозрачно-серым цветом. Водородные связи показаны пунктирными линиями (Derkach *et al.*, 2018).

Полимерные системы могут быть использованы для доставки лекарств с регулируемой скоростью высвобождения. Отрицательно заряженные к-каррагинан и альгинат обычно используется в комбинации с катионными заряженными биополимерами или катионным полиэлектролитом в качестве оболочки микрокапсул. Комбинация к-каррагинана и желатина в различных соотношениях оказалась полезной для модуляции профилей высвобождения лекарства. Авторы (Bonferoni *et al.*, 2004) успешно загрузили малеат тимолола в к-каррагинан-желатиновым сферы для офтальмологического применения.

Добавление 0.02 мас. % к-каррагинана в агарозные гели привело к увеличению прочности геля и снижению скорости диффузии модельных препаратов (лидокаин HCl, доксепин HCl, имипрамин HCl) (Sjöberg *et al.*, 1999).

Авторы (Santo *et al.*, 2009) установили, что к-каррагинан может быть прекрасным вариантом для разработки систем носителей для биологически активных агентов. А свойства гидрогелей можно варьировать путем комбинирования различных типов каррагинанов и путем их соединения с другими биополимерами. Нанопористость альгинатных гелей (размер пор ~ 5 нм) (Boontheeikul *et al.*, 2005), используется для обеспечения быстрой диффузии малых молекул через гель. Например, высвобождение флурбипрофена из ионно-сшитых, частично окисленных альгинатных гелей практически полностью происходит через 1.5 часа. Авторы (Wells *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2009) показали, что ионно-сшитые альгинатные микросферы эффективно инкапсулируют белки с высокой pI, такие как лизоцим и химотрипсин; эти белки, по-видимому, физически сшивают альгинат натрия, обеспечивая более устойчивое высвобождение.

Белково-полисахаридные композиты открывают множество возможностей для улучшения биологических и технологических функций. Современные приложения, включающие воспроизведение искусственных тканей для регенерации поврежденных органов, лечение ран, эффективные системы доставки лекарств, основаны на белково-полисахаридных композитных материалах (Michel *et al.*, 2020). Несмотря на ограниченное количество исследований, посвященных разработке белково-полисахаридных композитов, исследования доказали их эффективность и преимущества в различных областях (Bealer *et al.*, 2020).

Гидрогели имеют сходство с биологическими тканями (в набухом состоянии), демонстрируя превосходные механические свойства при сохранении пластичности и биосовместимости (Mohite *et al.*, 2017). По этой причине гидрогели используются в качестве биоматериалов в медицинских и фармацевтических целях (Perpas *et al.*, 1986; Rokhade *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2012). Они также используются в промышленности, сельском хозяйстве, водоподготовке, косметике и т.д. (Maziad *et al.*, 2004; Naziha *et al.*, 2015).

Выбор материала для тканевой и регенеративной медицины, а также технология изготовления биоконструкций из него зависит от области применения. Гидрогели могут принимать различные физические формы, а именно: твердое литье (используется в мягких контактных линзах), покрытие (используются в качестве слоя покрытия на внутренних капиллярных стенках при капиллярном электрофорезе и в катетерах, имплантатах, таблетках), прессованные активные матрицы (используемые в капсулах и пилюлях для перорального введения), микрочастицы и шарики (используемые в качестве резервуаров для лекарств при контролируемом высвобождении лекарств), инкапсулированные твердые материалы (используемые в осмотических насосах), капсулированные жидкости (при образовании гелей при охлаждении или нагревании), адгезивные агенты (используемые при приготовлении биоадгезивных носителей и перевязочных материалов) и т.д. (Maziad *et al.*, 2004; Rosiak *et al.*, 1999; Kashyap *et al.*, 2005).

Авторы (Lim *et al.*, 2010) сообщили о создании новых каркасов для тканевой инженерии, созданных на основе к-каррагинана и желатина. Пористость каркаса увеличивалась с увеличением содержания к-каррагинана. Имплантация каркаса в подкожную соединительную ткань крыс подтвердила, что каркас был биоразлагаемым.

Анализ биосовместимости полисахаридных и белок-полисахаридных гидрогелей *in vitro* показали более высокую жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани, посеянных на гидрогелевой смеси, по сравнению с однокомпонентными гидрогелями. Результаты показывают, что смеси желатина и к-каррагинана явно превосходят однокомпонентные гидрогели с точки зрения потенциала для тканевой инженерии (Tytgat *et al.*, 2018).

При добавлении желатина в водный раствор к-каррагинана наблюдалось улучшение прочности геля (Makshakova *et al.*, 2022). В белковых гелях к-каррагинан, вероятно, образует независимую сеть, которая поддерживает основную структуру, образованную белками во время гелеобразования (Gómez-Guillen *et al.*, 1996).

Желатиновые губки используются для остановки кровотечения из ран. Композитная матрица, полученная из альгината и желатина, имеет синергетические полезные аспекты обоих полимеров. Было обнаружено, что полученный материал обладает важными характеристиками, необходимыми для создания повязок для ран, такими как хорошая водопоглощаемость, биосовместимость, мягкие антисептические свойства и способность к биологическому разложению (Kabiri *et al.*, 2011).

Комбинация каррагинана и желатина в различных соотношениях оказалась полезной для модуляции профилей высвобождения лекарственных средств, реологических свойств гидратированных составов и их мукоадгезивных свойств (Li *et al.*, 2014). Поскольку мукоадгезивные свойства каррагинана весьма противоречивы, системы (Melchels *et al.*, 2012), в которых каррагинан взаимодействует как с лекарственным средством, так и с мукоадгезивным полимером, таким как желатин, должны улучшить этот аспект (Wust *et al.*, 2011).

Авторы (Sathuvan *et al.*, 2017) исследовали цитотоксические свойства к-каррагинана с загруженным в него куркумином на раковых клетках карциномы легкого человека линии A549. Исследования дозового ответа проводились с различными концентрациями к-каррагинана в диапазоне 50-500 г/мл, 10-100 г/мл и 10-100 г/мл в течение 24, 48 и 72 часов соответственно. Исследование цитотоксичности подтвердило, что куркумин не теряет своей терапевтической эффективности даже после конъюгации с к-каррагинаном, поскольку куркумин показал значительную клеточную токсичность для раковых клеток через 24, 48, 72 часа соответственно, а терапевтическая ценность увеличилась благодаря его эффективной доставке в клетки.

Каррагинан значительно подавляет рост раковых клеток шейки матки линии HeLa не только путем остановки клеточного цикла в определенных фазах, но и вызывая задержку в развитии клеточного цикла. к-Каррагинан задерживает клеточный цикл, что приводит к удлинению клеточного цикла по сравнению с клетками, обработанными и необработанными к-каррагинаном. Авторы (Prasedya *et al.*, 2016) подчеркнули, что для подтверждения этих результатов необходимы

исследования *in vivo* и испытания на других линиях раковых и нормальных клеток человека для более глубокой разработки к-каррагинана в качестве потенциального противоракового агента.

Гелевые системы с альгинатом натрия были высоко оценены как системы пероральной доставки лекарств с пролонгированным высвобождением. Были исследованы составы, содержащие альгинат натрия, фосфат кальция, бикарбонат натрия, лактозу и лекарственное средство (хлорфенирамин, салицилат натрия и кофеин). Обнаружено, что высвобождение лекарства является линейным и обратно пропорционально содержанию альгината. Высвобождение также зависело от лекарственного средства, причем катионное лекарственное средство хлорфенирамин имеет более медленную скорость высвобождения, чем анионное лекарственное средство – салицилат натрия. Это было связано с электростатическим взаимодействием между катионными лекарственными средствами и отрицательно заряженным альгинатом (Stockwell *et al.*, 1986).

Авторы (Thomas *et al.*, 2000; Bouhadir *et al.*, 2001) продемонстрировали потенциал альгината и желатина в качестве инъеклируемых каркасов для формирования *in situ* для тканевой инженерии и доставки лекарств. А авторы (Wells *et al.*, 2007) показали, что метотрексат (не взаимодействующий с альгинатом) быстро высвобождается путем диффузии, в то время как доксорубин, ковалентно связанный с альгинатом, высвобождается химическим гидролизом сшивающего агента.

Гелевые микросферы получали путем выкапывания водного раствора альгината в водный раствор хлорида кальция с образованием частиц для пероральной доставки белков. Гели защищают белки, неустойчивые к действию кислот, такие как инсулин, от денатурации в желудочной среде (Chan *et al.*, 2010).

Разработка и создание белок-полисахаридных гидрогелей с улучшенными или новыми свойствами потенциально могут быть достигнуты с использованием различных модифицирующих добавок (Petka *et al.*, 1998). Длительное высвобождение теofilлина было достигнуто из микросфер альгината за счет добавления в систему углеродных нанотрубок (УНТ). Добавление УНТ усиливало

механическую стабильность гелей, влияя на структуру и морфологию микросфер. В сконструированных системах не наблюдалось значительной цитотоксичности, что указывает на потенциальную применимость гидрогелевых микросфер с добавлением УНТ в качестве носителя для доставки препаратов в кишечник и толстую кишку (Zhang *et al.*, 2010).

Белок-полисахаридные гидрогели являются перспективными материалами для широкого спектра медицинских применений, от тканевой инженерии до контролируемой доставки лекарств. Особенно благодаря возможности модулировать физико-химических и механических свойств белок-полисахаридных гидрогелей путем использования различных модифицирующих добавок (Petka *et al.*, 1998). Одним из перспективных модификаторов благодаря своим уникальным физическим и химическим свойствам являются углеродные нанотрубки (УНТ).

#### **1.4 Углеродные нанотрубки, как модификатор свойств белок-полисахаридных гидрогелей**

Популярность гидрогелей и их наноструктурированных композитов получили широкое распространение в наномедицине и представляют большой интерес благодаря присущим им уникальным свойствам (Zhao, *et al.*, 2015). Тем не менее, набор и диапазон этих свойств все равно не может охватить все потребности развивающихся областей их применения для чего используются различные структурные модификаторы, которые предпочтительно имеют те же нанометровые размеры, что и супрамолекулярная структура белок-полисахаридных гидрогелей. Одним из таких модификаторов выступает графитовый наноматериал, который демонстрируют исключительные структурные, оптические, тепловые, электрические и механические свойства. Классическим представителем такого графитового модификатора являются одностенные и многостенные углеродные нанотрубки (УНТ). Например, использование УНТ обеспечивает эффективный перенос электронов при конструировании биоэлектрохимических устройств,



функциональных интерфейсов и моделировании нервных тканей на основе гидрогелей (Simon *et al.*, 2019). Кроме того, УНТ могут даже устранять токсическое действие сшивающих агентов в гидрогелях (Cirillo *et al.*, 2014).

Углеродные нанотрубки представляют собой протяженные полые цилиндрические углеродные структуры, образованные свернутым в цилиндр графеновым листом. По количеству свернутых в трубку графеновых плоскостей УНТ делятся на два класса: одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ) и многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) (рис. 1.16) (Li *et al.*, 2005). Рентгенограммы УНТ показывают дифракционный  $2\theta = 25.5^\circ$  может быть индексирован как отражение C(002) гексагональной графитовой структуры. Другие характерные дифракционные пики графита при  $2\theta$  около  $43^\circ$ ,  $53^\circ$  и  $77^\circ$  связаны с дифракцией C(100), C(004) и C(110) графита, соответственно (Tawfik *et al.*, 2013)

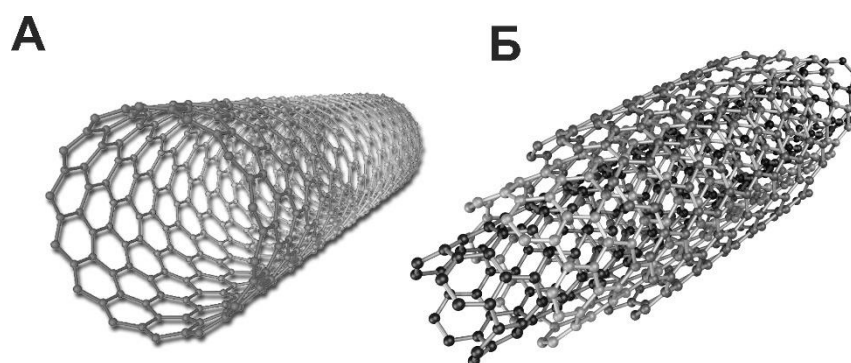


Рисунок 1.16 – (А) Одностенные и (Б) многостенные углеродные нанотрубки.

ОУНТ и МУНТ существенно отличаются друг от друга по физическим свойствам из-за их структурных различий. Наиболее важной особенностью, которая отличает ОУНТ, является то, что ОУНТ можно описать как листы графена, свернутые в полые цилиндры, поэтому их часто называют графеновыми нанотрубками. В отличие от ОУНТ, МУНТ может рассматриваться состоящей из нескольких слоев графена, свернутых в трубку. Расстояния между каждым слоем близки к межслоевому расстоянию в графите (0.34 нм). Эти различия между ОУНТ и МУНТ приводят к существенно разным свойствам и соответствующему

воздействию на материалы после их введения.

По механическим свойствам УНТ превосходят большинство других наноматериалов. При изгибании УНТ проявляют исключительную эластичность, образуют своеобразные узлы, которые способны распрямляться. Это свойство отличает УНТ от большинства других материалов, имеющих сопоставимую прочность, но являющихся весьма хрупкими. По удельной, отнесенной к плотности, прочности УНТ заметно превосходят все остальные материалы. Теплопроводность и электрическая проводимость индивидуальных УНТ очень высока. Введение УНТ в полимерные матрицы заметно увеличивает их электропроводящие свойства, теплопроводность и теплостойкость.

Включение УНТ в состав биополимерного композита требует равномерного распределения нанонаполнителя в объеме полимерной матрицы (Basavegowda *et al.*, 2021). При этом максимальное эффективное содержание УНТ в образце может варьироваться от 0.001 до 0.1 мас. %, что связано с низким значением порога перколяции, свидетельствующем об образовании в объеме полимерной матрицы непрерывной сетчатой структуры из УНТ (Сырачев и др., 2011).

Высокая степень агрегации УНТ препятствует образованию стойких однородных дисперсий в водных средах и проявлению их уникальных физико-механических свойств. К методам, облегчающим процесс дезагрегации и стабилизации УНТ, относится функционализация поверхности УНТ, которая не вызывает никаких изменений физических свойств или структурных повреждений УНТ (Nan *et al.*, 2016).

Другим способом диспергирования УНТ в водной среде является использование изоляции их поверхности от взаимодействия с водой. Это может быть достигнуто путем взаимодействия между графитовой поверхностью УНТ и сопряженными молекулами, такими как ПАВ или биополимеры. Для включения УНТ в живые системы, безусловно, более подходящим является диспергирование УНТ с биополимерами (Mahajan *et al.*, 2018), например, с желатином (Li *et al.*, 2004). Желатин оказывает желаемое воздействие на поверхность УНТ, улучшая их гидрофильность, что приводит к высокой дисперсности и долгосрочной

стабильности УНТ в водной среде (Venkatesan *et al.*, 2012). На рисунке 1.17 показано схематическое изображение полимерной упаковки УНТ, которые были обернуты желатиной с последующим обработкой в ультразвуковой ванне.

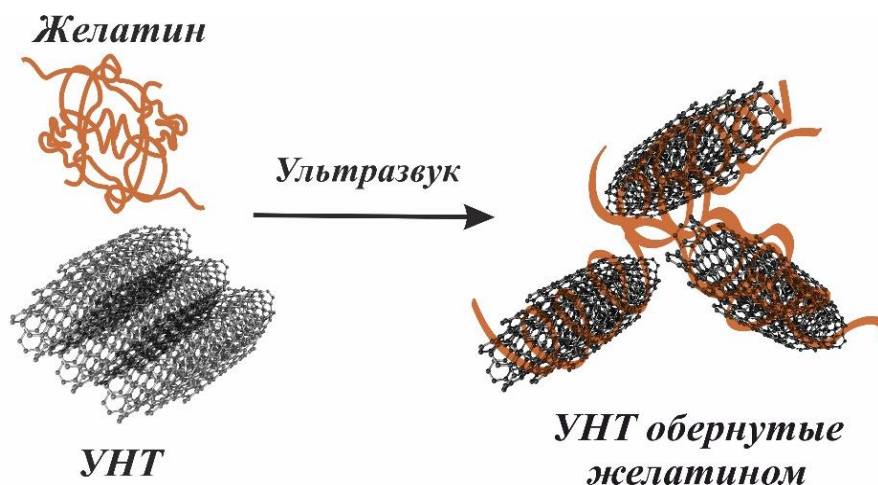


Рисунок 1.17 – Схематическое изображение полимерной упаковки УНТ с помощью желатина.

Исследования, проведенные на УНТ-полимерных композитах (Yang *et al.*, 2004), показывают, что три основных фактора сильно влияют на армирование полимера: хорошая диспергирование УНТ в полимерной матрице (Lillehei *et al.*, 2009), прочная межфазная связь между УНТ и полимером (Xu *et al.*, 2002) и однородное распределение УНТ в полимерной матрице (Xie *et al.*, 2005).

Функционализированные УНТ могут быть использованы для улучшения их биосовместимости в организме, увеличения инкапсуляционной емкости, растворимости и мультимодальной доставки лекарств. Функциолизация поверхности УНТ снижает токсичность УНТ (Liu *et al.*, 2014).

Ключевым моментом прикладного использования УНТ в разнообразных биомедицинских приложениях является их способность к переносу в ткани организма больших доз агентов, оказывающих терапевтический и диагностический эффекты. В то же время практическое применение УНТ в медицине и биотехнологии тормозится из-за имеющихся вопросов об их токсичности на клеточном и организменном уровнях. Введение УНТ в организм

экспериментальных животных в зависимости от строения и дозы наноматериала может вызывать широкий спектр эффектов: от положительных до резко негативных (Dong *et al.*, 2015).

Эффекты цитотоксичности УНТ сильно зависят от их физико-химических характеристик, таких как длина, диаметр, площадь поверхности, склонность к агрегации, а также наличие и природы остатков катализатора, образующихся в процессе изготовления УНТ (Lanone *et al.*, 2013). Эти характеристики схематично представлены на рисунке 1.18.

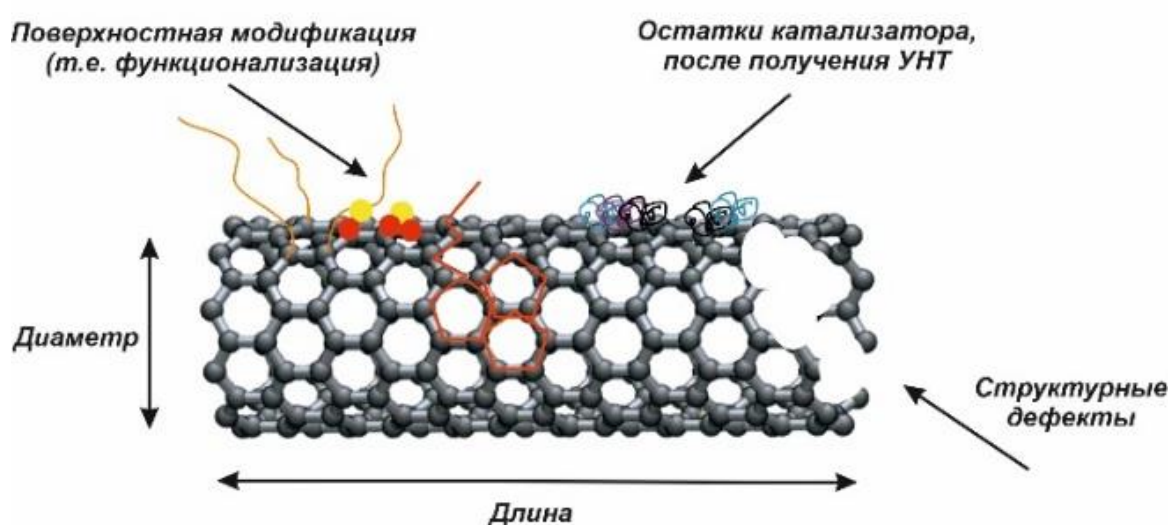


Рисунок 1.18 – Схематичное изображение факторов, вызывающие токсичность УНТ (Lanone *et al.*, 2013).

На основании анализа литературных данных можно отметить зависимость биологических эффектов от структуры и типа УНТ. На сегодняшний день признано, что ОУНТ являются более активными и токсичными для микроорганизмов и клеточных культур по сравнению с МУНТ (Jackson *et al.*, 2013).

В работах авторов (Purov *et al.*, 2007; Зегря и др., 2009) говорится о целенаправленном введении УНТ в организм для достижения положительных медицинских эффектов, в том числе для регенерации ткани, адресной доставки лекарств и др. Имеются данные о хорошей биосовместимости УНТ,

положительном взаимодействии фибробластов, остеобластов и остеокальцина с очищенными УНТ с остаточным содержанием магния и кальция.

УНТ также могут выступать хорошими абсорбентами для гидрофобных органических соединений. На примере противомикробного соединения триклокарбана, известного своей токсичностью, гидрофобностью, биоаккумуляцией и стойкостью в окружающей среде показано, что МУНТ способны адсорбировать и существенно ослаблять цитотоксичность и биодоступность для трех клеточных культур (клеток печени радужной форели (RTL-W1), клеток карциномы коры надпочечников человека (T47 D1uc), и клеток аденокарциномы человека (H295R)) (Simon *et al.*, 2014).

В зависимости от своих физико-химических свойств эффекты влияния УНТ на клетки могут существенно меняться, однако механизмы действия пока до конца не изучены (Firme *et al.*, 2010). Как известно, из-за своих гидрофобных свойств, УНТ создают большие агломераты, что может привести к переоценке их токсичности. Было показано (Warheit *et al.*, 2004), что при интраназальном введении 5 мг/кг ОУНТ в физиологическом растворе наблюдается высокая смертность крыс (15%), однако эта смертность была вызвана не токсичностью ОУНТ, а из-за воздействия агломератов, которые застревают в дыхательных путях.

Проведенные исследования авторов (Matsumoto *et al.*, 2012) указывают на то, что токсичность углеродных нанотрубок может зависеть и от способа введения его в организм. Ежедневное внутрижелудочное введение крысам ОУНТ в дозах 0.125–1.25 мг/кг и МУНТ – 0.5–50 мг/кг в течение 28 дней не оказывает токсического эффекта на организм животных. Наноматериалы проходили желудочно-кишечный тракт и вывелились из организма с фекалиями.

В настоящее время активно исследуются возможные негативные последствия влияния УНТ на организм млекопитающих, однако эти исследования пока разрозненны и противоречивы (Hougaard *et al.*, 2013). Экспериментальные данные авторов (Kumarathasan *et al.*, 2014) показывают, что цитотоксичность УНТ зависит от метода анализа и от использованных клеток. Полученные результаты демонстрируют важность использования нескольких анализов клеточной

цитотоксичности и типов клеток для определения токсичности, а также надлежащей физико-химической характеристики наноматериалов.

Эпителиальные клетки легких являются основными мишенями воздействия УНТ, так как наночастицы участвуют в фиброзе легких, регулируя деятельность фибробластов, например, пролиферацию и миграцию посредством высвобождения профиброгенных медиаторов (Mishra *et al.*, 2012).

Авторы (Manna *et al.*, 2005) с помощью МТТ-анализа продемонстрировали дозозависимое снижение жизнеспособности эпителиальных клеток легких человека A549 и H1299 после обработки ОУНТ (0.1-10 мкг/мл). Также наблюдалось дозозависимое снижение жизнеспособности клеток ряда эпителиальных клеток легких, включая клетки H596, H446 и Calu-1 после воздействия МУНТ (0.002-0.2 мкг/мл) в течение 4 дней (Manna *et al.*, 2006). Последующие исследования показали, что агрегация УНТ определяет их клеточную токсичность в эпителиальных клетках легких A549 (Davoren *et al.*, 2007; Wick *et al.*, 2007). В отличие от этого, авторы (Pulskamp *et al.*, 2007) сообщили об отсутствии токсичности в альвеолярных макрофагах крысы NR8383 и эпителиальных клетках легких A459 после воздействия ОУНТ или МУНТ (5-100 мкг/мл) в течение 24 ч.

Проанализировав имеющиеся публикации, можно сделать выводы, что внимание исследователей сфокусировано на ингаляционном пути введения, а пероральное воздействие остается практически не изученным несмотря на то, что оно является одним из наиболее вероятных сценариев поступления наноматериалов в организм (Lan *et al.*, 2012). Все вышесказанное подтверждает разнонаправленность биологического действия различных УНТ и необходимость вдумчивого подхода к оценке токсичности наноматериалов с учетом их особых физико-химических свойств.

## **1.5 Формулировка цели исследования**

Таким образом, суммируя результаты проведенного анализа литературных данных, изложенных в данной главе, следует отметить, что несмотря на большое

количество научных работ, посвященных исследованию структуры и свойств белок-полисахаридных гидрогелей и анализу влияния углеродных нанотрубок на эти характеристики, имеющиеся данные достаточно фрагментарны и противоречивы. Достаточно мало экспериментальных работ по структуре физических гидрогелей, влиянию углеродных нанотрубок на структуру и физико-химические характеристики белок-полисахаридных гидрогелей. Несмотря на большое количество обзорных работ по различным свойствам белок-полисахаридных гелей практически отсутствуют планомерные исследования взаимного влияния состава гидрогелей и их супрамолекулярной структуры на различных размерных масштабах, потенциала этих систем для доставки биологически-активных веществ при параллельном контроле возможных токсических эффектов. Поэтому необходимо проведение широкомасштабных исследований структуры и свойств конкретных белок-полисахаридных гидрогелей, поиску взаимосвязей «структура-свойство» и модифицирующих эффектов углеродных нанотрубок, чему и посвящается настоящее исследование.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследования были выбраны:

– белок желатин тип А, полученный кислотной обработкой свиных шкур, с твердостью по Блуму 300 производства «Sigma-Aldrich» (США, артикул G2500).

Молекулярная масса желатина ~100 кДа;

– анионные полисахариды:

1. κ-каррагинан типа I фирмы производителя «Sigma-Aldrich» (США, артикул 22048); порошок от белого до светлого бежевого цвета, содержание калия ( $K^+$ ) <11 %, кальция ( $Ca^{2+}$ ) <3.5 %, натрия ( $Na^+$ ) <2.0 %. Молекулярная масса 430 кДа; вязкость 5–25 мПа·с (0.3 % водного раствора, при 25°C);

2. альгинат натрия из бурых морских водорослей производства «Sigma-Aldrich» (США, артикул 180947) с молекулярной массой 120-190 кДа, вязкость 15-25 мПа·с (1 мас. % водного раствора).

В качестве модифицирующей добавки были использованы многостенные углеродные нанотрубки углеродного наноматериала «Таунит» (рис. 2.1, табл. 2.1) производства ООО «НаноТехЦентр» (г. Тамбов), полученные методом газофазного химического осаждения (CVD) в процессе каталитического пиролиза углеводородов.

Таблица 2.1 – Характеристики углеродного наноматериала «Таунит»

Наружный диаметр, нм	20-50
Внутренний диаметр, нм	10-20
Длина, мкм	>2
Общий объём примесей (%)	<1
в т.ч. аморфный углерод	0.3–0.5
Насыпная плотность, г/см <sup>3</sup>	0.4–0.5
Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	>120
Термостабильность, °С	<700
Средний объём пор, см <sup>3</sup> /г	0.22
Средний размер пор, А	70



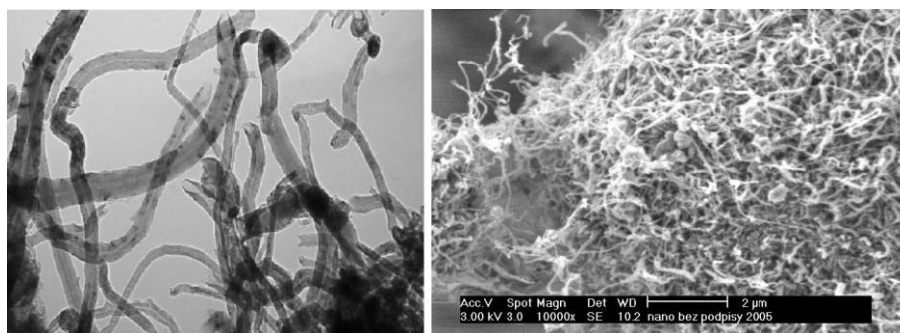


Рисунок 2.1 – Микроструктура УНТ «Гаунит», полученная методом сканирующей электронной микроскопии (Ткачев, 2007).

Для исследования иммобилизации биологически активных веществ в белок-полисахаридную матрицу использовались:

*Бриллиантовый зеленый (БЗ)* (тетраэтил-4,4-диаминотрифенилметана оксалат,  $C_{27}H_{34}N_2O_4S$ ) – катионный синтетический краситель трифенилметанового ряда. Молекулярная масса 475.6 Да. В работе использован БЗ производства ЗАО «Ярославская фармацевтическая фабрика» (Россия). В качестве растворителя для БЗ использовался 95% этанол. Концентрация рабочего раствора составляла 10 мг/мл.

*Флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ)* (диоксифлуоран,  $C_{20}H_{12}O_5$ ) – нейтральное органическое соединение, относящееся к группе ксантеновых красителей, входящей в класс трифенилметановых красителей. Молекулярная масса 389.4 Да. В работе использован ФИТЦ фирмы «Sigma-Aldrich» (США). В качестве растворителя для ФИТЦ использовался 95% этанол. Концентрация рабочего раствора составляла 4 мг/мл.

*Метиловый оранжевый (МО)* (4-(4-диметиламинофенилазо) бензолсульфонат натрия,  $C_{14}H_{14}N_3O_3SNa$ ) – анионный синтетический органический краситель из группы азокрасителей, является солью натрия. Молекулярная масса 327.33 Да. В работе применялся МО производства «Шосткинский завод химреактивов» (Россия). В качестве растворителя для ФИТЦ использовался 95% этанол. Концентрация рабочего раствора составляла 0.1 мг/мл.

*Рибофлавин* (витамин  $B_2$ ,  $C_{17}H_{20}N_4O_6$ ) – 6,7-Диметил-9- (D-1-рибитил) – изоаллоксазин. В работе использовался рибофлавин фирмы «Sigma-Aldrich»

(США). Молекулярная масса 376.36 Да. В качестве растворителя для витамина В<sub>2</sub> использовался трис-НСl буфер «Helicon» (Россия), рН=7.4.

*Фолиевая кислота* (витамин В<sub>9</sub>, С<sub>19</sub>Н<sub>19</sub>Н<sub>7</sub>О<sub>6</sub>) – N-4-2-амино-1,4-дигидро-4-оксо-6-птеридил) метиламинобензоил-L (+) –глутаминовая кислота. Использовалась фолиевая кислота фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Молекулярная масса 441.4 Да. В качестве растворителя для витамина В<sub>9</sub> использовался трис-НСl буфер «Helicon» (Россия), рН=7.4.

*Липаза* (КФ 3.1.1.3) – фермент, катализирующий гидролиз триглицеридов до глицерина и свободных жирных кислот. В работе использовали липазу *Candida rugosa* производства «Sigma-Aldrich» (США). Молекулярная масса 57 кДа, рI=5.3-5.7. В качестве растворителя использовался трис-НСl буфер («Helicon» Россия), рН=7.4. Концентрация рабочего раствора составляла 1.2 мг/мл.

*Биеназа* (КФ 3.1.27.3) – бактериальная РНКаза *Bacillus intermedius* 7P дикого типа с молекулярной массой 12.3 кДа, рI=9.5 (Schulga *et al.*, 1998). В качестве растворителя использовался трис-НСl буфер («Helicon», Россия), рН=7.4. Биеназа проявляет иммуностимулирующее, противовирусное и противоопухолевое действие (Kurinenko *et al.*, 1988). Концентрация рабочего раствора составляла 1.8 мг/мл. Биеназа была любезно предоставлена сотрудниками кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Цитотоксическое действие гидрогелей на основе желатина, κ-каррагинана и альгината наблюдали на раковых клетках шейки матки HeLa (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Россия) и раковых клетках аденокарциномы человека A549 (Американская коллекция клеточных культур, Роквилл, США).

Все образцы готовили в ультрачистой воде, очищенной с помощью системы очистки воды «Arium Mini» («Sartorius», Германия).

### 2.1.1 Приготовление растворов на основе белка, полисахаридов и углеродных нанотрубок

Водные смеси на основе желатина с к-каррагинаном и желатина с альгинатом натрия получали смешением исходных растворов желатина, к-каррагинана и альгината натрия.

Раствор желатина готовили по стандартной методике с предварительным набуханием в воде при комнатной температуре с последующим растворением при 50°C (Измайлова, 2000).

Водные смеси желатина с УНТ и без них подвергались обработке ультразвуком с частотой 35 кГц в течение 60 минут при температуре 50°C в водяной бане ультразвукового диспергатора «Bandelin SONOREX TK52» (Германия). Образцы, содержащие УНТ, центрифугировали 10 мин при 10000 g на центрифуге «СМ 50V Elmi» (Латвия) для отделения твердого осадка. Далее для исследований отбирали супернатант, который содержал УНТ, диспергированный в растворе желатина. рН 1%-го раствора желатина 5.2. Добавление УНТ не влияет на рН раствора желатина.

Растворы к-каррагинана и альгината натрия растворяли при 70°C после его предварительного набухания в воде при комнатной температуре. рН 1%-ого раствора к-каррагинана 8.2, а рН 1%-ого раствора альгината натрия 8.

Растворы желатина и к-каррагинана, а также желатина и альгината натрия смешивали в требуемом объемном соотношении при 50°C и помещали в ультразвуковой диспергатор на 60 минут. рН смеси полимеров составляла 5.5 (Сао *et al.*, 2015).

Массовое соотношение белка и полисахарида в смесях Z (г полисахарид/ г белок), определялось по формуле (2.1) (г полисахарид/ г белок).

$$Z = \frac{C_{\text{(полисахарида)}}}{C_{\text{(белока)}}}, \frac{\text{г полисахарида}}{\text{г белка}}. \quad (2.1)$$

## 2.2 Метод турбидиметрического титрования

Водные смеси желатина с ионным полисахаридом могут происходить с образованием полиэлектролитных комплексов (ПЭК) (Zyoud *et al.*, 2015). ПЭК желатина с полисахаридом, формирующиеся в водных системах (Michon *et al.*, 1995; Marrs *et al.*, 1997), способны к самоорганизации и сохранению устойчивости при варьировании внешних условий в широких пределах (Kabanov *et al.*, 2005).

Турбидиметрическое титрование для водных белок-полисахаридных комплексов проводили для определения массового соотношения белок-полисахарид, при котором образуются стехиометричные полиэлектролитные комплексы. Раствор желатина титровали раствором полисахаридов, измеряя оптическую плотность смеси.

Турбидиметрические измерения проводились на спектрофотометре «Lambda 25» («Perkin Elmer», США) с термостатируемым кюветным отделением. Во время проведения измерений температура ( $T=23^{\circ}\text{C}$ ) оставалась неизменной. Эксперимент проводился в видимой области спектра при длине волны  $\lambda=400$  нм.

## 2.3 Порошковая рентгеновская дифрактометрия

Исследования методом порошковой рентгеновской дифрактометрии (ПРД) являются эффективным инструментом для изучения аморфной/кристаллической структуры полимеров. Фазовый рентгеновский анализ основан на том, что каждая фаза имеет свою специфическую кристаллическую решетку с определенными параметрами и ей соответствует на рентгенограмме своя система линий. Поэтому при анализе вещества, представляющего собой смесь нескольких фаз, получается рентгенограмма, на которой присутствуют линии всех фаз, входящих в состав образца. Проводя расчет и индентирование линий рентгенограммы, можно получить точные данные о качественном составе исследуемого вещества. Применяя специальные методы фазового анализа, можно определить не только качественный, но и количественный фазовый состав (Бокий и др., 1964). Если образец представляет собой смесь порошков нескольких веществ (фаз), его

рентгенограмма будет результатом наложения дифракционной картины каждой фазы. Задача фазового анализа состоит в том, чтобы определить, какие фазы и в каком количестве входят в образец. Дифракционные пики на экспериментальной дифрактограмме необходимо разделить по фазам, используя методику идентификации.

При расшифровке рентгенограмм используется уравнение Вульфа-Брэгга:

$$n\lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad (2.2)$$

где  $n$  – порядок дифракционного отражения,  $\lambda$  – длина волны,  $d$  – межплоскостное расстояние между отражающими плоскостями,  $\theta$  – угол, который составляет падающий или дифрагированный луч с отражающей плоскостью.

Рентгенодифракционные эксперименты были выполнены в Отделении рентгеноструктурных исследований Центра коллективного пользования ЦКП САЦ на базе Лаборатории дифракционных методов исследования ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН на рентгеновском дифрактометре «D8 Advance («Bruker», США), оснащенный приставкой «Vario» и линейным координатным детектором «Vantec». Использовано Cu-K $_{\alpha 1}$  излучение ( $\lambda=1.54063 \text{ \AA}$ ), монохроматизированное изогнутым монохроматором Йохансона, режим работы рентгеновской трубки 40 кВ, 40 мА. Эксперименты выполнены при комнатной температуре в геометрии Брэгг-Брентано с плоским образцом.

Образцы в гелеобразном виде наносились на поверхность пластинки монокристаллического кремния, обладающей минимальным фоновым рассеянием. Порошковые дифрактограммы записаны в режиме реального времени в диапазоне  $2\theta$  от 3 до 60°, с шагом 0.008° и временем набора 0.1 сек в точке, время съемки одного скана равнялось 14 минутам. Порошкообразные образцы так же без давления наносились на поверхность стандартной пластинки монокристаллического кремния, дифрактограммы получены в диапазоне  $2\theta$  от 3 до 70°, с шагом 0.008° и временем набора 0.1-1 сек. Обработка полученных данных выполнена с использованием пакета программ «EVA» (DIFFRAC Plus, 2005). Для идентификации кристаллических фаз была использована база данных порошковой дифрактометрии «PDF-2» (ICDD PDF-2, Release 2005-2009).

## 2.4 Малоугловое рентгеновское рассеивание

Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей (МУРР) – метод, использованный для структурной характеристики биомолекулярных систем с разрешением в несколько нанометров (нм). Этот метод предоставляет информацию об общей конформации и структурных изменениях биологических макромолекул в растворе (Feigin *et al.*, 1987). Биологические системы часто удовлетворяют требованиям монодисперсности.

Интенсивность рассеяния от такой системы описывается интегральным уравнением (2.3):

$$I(s) = 4\pi \int_0^{D_{max}} p(r) \frac{\sin(sr)}{sr} dr \quad (2.3)$$

где

$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty s^2 I(s) \frac{\sin(sr)}{sr} ds \quad (2.4)$$

функция парных расстояний, которая является обратным Фурье-преобразованием интенсивности рассеяния  $I(s)$ , где  $s$  – волновой вектор рассеивания, определяемый по формуле  $s = (4\pi/\lambda) \cdot \sin(\theta/2)$ . Физически функция парных расстояний описывает количество всевозможных расстояний между двумя точками в частице в интервале от  $r$  до  $r+dr$ . Эта функция распространяется также на интервал  $(0, D_{max})$ , где  $D_{max}$  – наибольшее расстояние между двумя точками внутри частицы, т.е. в случае гомогенной частицы – ее максимальный размер.

Учитывая, что вид кривой малоуглового рентгеновского рассеяния существенно зависит от формы частиц (макромолекул), очевидно, что полученная функция распределения по расстояниям так же будет иметь характерный вид и параметры для частиц различной морфологии (рис. 2.2) (Svergun *et al.*, 2003).

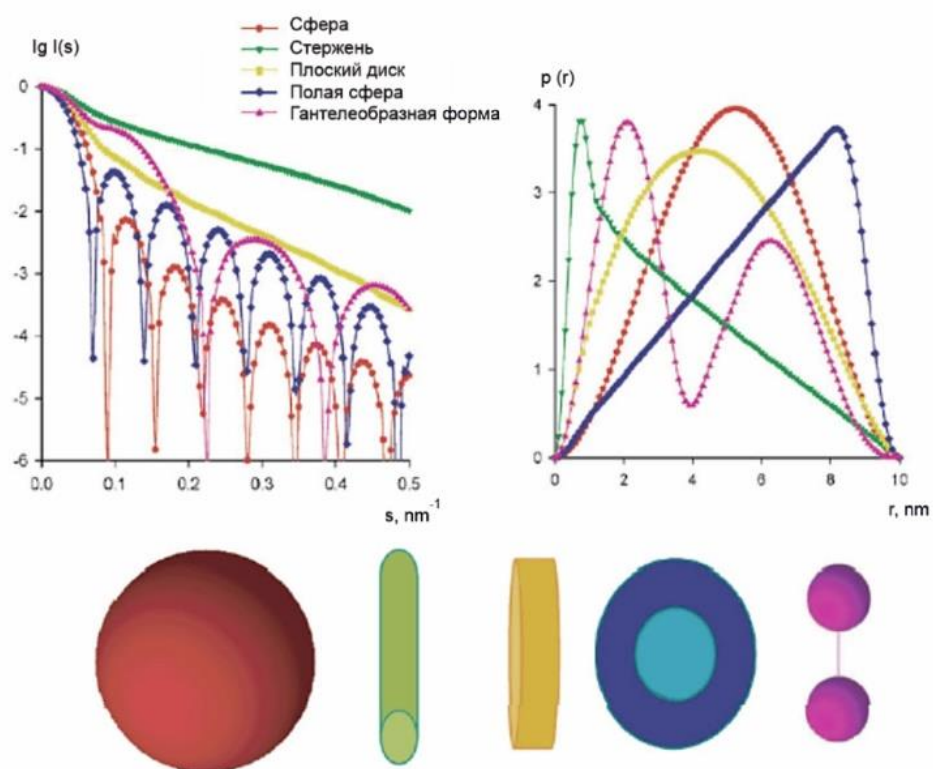


Рисунок 2.2 – Интенсивности рассеяния и вид соответствующих функций распределения по расстояниям для различных геометрических тел (Svergun *et al.*, 2003).

Наиболее широко используемый структурный параметр – радиус инерции частиц  $R_g$ , который определяется по начальному участку кривой рассеивания в области малых значений  $s$  с помощью формулы Гинье (2.5) (Glatter *et al.*, 1982):

$$\ln I(s) \approx \ln I(0) - \frac{R_g^2 \cdot s^2}{3} \quad (2.5)$$

Для сильно вытянутых анизометричных частиц по графику Гинье удастся определить радиус инерции поперечного сечения  $R_c$ :

$$\ln [sI(s)] = \ln [I_c(0)] - \frac{R_c^2 \cdot s^2}{2} \quad (2.6)$$

Точность определения  $R_g$  из графика Гинье ( $\ln(s)$  от  $s^2$ ) зависит от ряда факторов. Прежде всего, в начальной области кривой рассеяния существенную роль могут играть эффекты межчастичной интерференции. Для устранения их влияния выполняют экстраполяцию к бесконечному разведению: проводят измерения для нескольких достаточно малых концентраций образца и приводят данные к «нулевой» концентрации, считая, что величина интерференционных эффектов

линейно зависит от концентрации. Другим источником искажений является возможное образование агрегатов частиц. Это приводит к резкому возрастанию интенсивности  $I(s)$  для самых углов рассеяния (Свергун и др., 1986).  $R_g$  для сферических частиц определяется, как  $R_g = \sqrt{\frac{3}{5}} R$ , а для цилиндрических ( $r$ -радиус цилиндра,  $h$ -высота цилиндра):  $R_g = \sqrt{\frac{r^2}{8} + \frac{h^2}{12}}$ .

Первичная обработка данных МУРР состоит в ряде операций с набором экспериментальных данных, тщательность выполнения которых определяет количество и качество полученной структурной информации.

В настоящей работе были использованы программные пакеты «SASView» (SASView 3.0.0, 2009-2013) и «PRIMUS» (Konarev *et al.*, 2003), позволяющие, в том числе, выполнение предварительного анализа исходных экспериментальных данных МУРР, что обеспечивает необходимый и достаточный базис для дальнейшего структурного анализа. Процесс первичной обработки включает в себя статистический анализ набора кривых малоуглового рассеяния для данного образца за период измерения, их усреднение и масштабирование. С помощью программного блока «PRIMUS» проводится калибровка и нормализация данных, вычитание рассеяния фоном (растворителем, матрицей), сшивка кривых рассеяния, измеренных на разных угловых интервалах, концентрационный анализ, вычисление инвариантов с использованием графиков Гинье и Порода для упорядоченных или частично упорядоченных объектов, моделирование экспериментальных данных рассеянием от различных геометрических тел, анализ смесей.

Первоначально из экспериментальных кривых МУРР исследуемых образцов определялись независимые от выбранной модели структурные параметры, такие как радиус инерции  $R_g$  частиц (из анализа графиков Гинье) в предположении их сферической формы, радиус инерции для толщины или поперечного сечения сильно анизометричных частиц  $R_c$  из модифицированных графиков Гинье (что характерно для белок-полисахаридных гидрогелей), а анализ графиков Кратки



$(I(s) \cdot s^2$  от  $s$ ) (Svergun *et al.*, 2003) позволяет сделать выводы о степени свернутости макромолекулярных цепочек.

Функция интенсивности рассеивания для случайно ориентированных цилиндрических структур рассчитывается по формуле:

$$P(s) = \frac{scale}{V} \int_0^{\pi/2} F^2(s, \alpha) \sin \alpha d\alpha + \text{фон} \quad (2.7)$$

где

$$F(s, \alpha) = 2(\Delta\rho) \cdot V \frac{\sin(\frac{1}{2}s \cdot L \cdot \cos\alpha)}{\frac{1}{2}s \cdot L \cdot \cos\alpha} \cdot \frac{J_1(s \cdot R \cdot \sin\alpha)}{q \cdot R \cdot \sin\alpha} \quad (2.8)$$

где  $\alpha$  – угол между осью цилиндра и  $s$ ;  $V = \pi R^2 L$  объем цилиндра;  $L$  – длина цилиндра;  $R$  – радиус цилиндра и  $\Delta\rho$  – разница электронных плотностей между рассеивателем и растворителем.

Для получения структурной информации и описания экспериментальных данных использовались различные модели. В частности, было установлено, что сконструированные гидрогели могут быть должным образом описаны с помощью гелевой модели Гаусса-Лоренца (Evmenenko *et al.*, 2001) и цилиндрической (McAulay *et al.*, 2020), которая в ряде работ использовалась для анализа строения гелей различной природы и состава (Shibayama *et al.*, 2011). Гелевая модель Гаусс-Лоренц позволяет анализировать рассеяние от структуры физических гелей. Интенсивность рассеяния моделируется суммой слагаемых, одно из которых экспоненциального вида, в области малых значений волнового вектора  $s$  (и которое схоже с функциональной формой, соответствующей рассеянию Гинье), а в области более высоких значений  $s$  использовано лоренцево приближение. Интенсивность рассеивания рассчитывается:

$$I(q) = I_G(0) \cdot \exp\left(\frac{-s^2 \Xi^2}{2}\right) + \frac{I_L(0)}{1+s^2 \xi} \quad (\Xi \gg \xi) \quad (2.9)$$

$\Xi$  – средний размер статических корреляций в геле;  $\xi$  – динамическая корреляционная длина, которую можно отнести к колебаниям полимерных цепей между сшивками.  $I_G(0)$  и  $I_L(0)$  – коэффициенты масштабирования для каждой из этих структур.

Эксперименты по малоугловому рентгеновскому рассеиванию были выполнены в Отделении рентгеноструктурных исследований Центра коллективного пользования ЦКП САЦ на базе Лаборатории дифракционных методов исследования ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН на дифрактометре «Nanostar» («Bruker», США) (излучение Cu-K $\alpha$ ,  $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ , режим работы рентгеновской трубки 40 кВ, 35 мА), оборудованном двумерным детектором HiStar. Монохроматизация и коллимация рентгеновского пучка осуществлялась парой взаимно перпендикулярных зеркал Геббеля и трехточечных коллиматоров диаметром 1000, 400 и 750 мкм. Расстояние образец-детектор равно 63.5 см и контролируется с помощью калибровочного образца AgBh. Анализ экспериментальных данных был выполнен после вычитания фонового рассеяния капилляра с водой и калибровки кривых на интенсивность рассеяния эталоном (аморфный графит).

Эксперименты были выполнены при температурах в различных состояниях 14°C (состояние геля) и 35°C (состояние золя) с образцами «на просвет», помещенными в стеклянные капилляры диаметром 2 мм, которые затем герметично закрывали и помещали в стандартных держателях в вакуумируемую камеру дифрактометра. Интегрирование двумерных картин рассеяния выполнялось с помощью пакета программ «SAXS» (SAXS Version 4.0 *et al.*, 2000), расчеты структурных параметров, моделирование и графическое представление результатов выполнены с использованием пакетов программ «SASView» (SASView 3.0.0, 2009-2013) и «PRIMUS» (Konarev *et al.*, 2003).

## 2.5 Метод сканирующей электронной микроскопии

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) использовалась для изучения морфологии гидрогелей желатина, к-каррагинана и альгината, а также гелей, сформированных ПЭК к-каррагинан-желатина в «чистом» виде и при добавлении УНТ.

Наиболее важным этапом в проведении исследования гидрогелей методом

СЭМ является пробоподготовка. Для получения изображений СЭМ гидрогели на основе к-каррагинана и желатина, а также образцы при добавлении УНТ, фиксировали 2%-ным глутаральдегидом в течение 1 часа и обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола. Затем образцы погружали на 3 минуты в 100 % гексаметилдисилазан, а избыток гексаметилдисилазана удаляли фильтровальной бумагой. Затем образцы переносили в эксикатор на 25 минут. После сушки образцы монтировали на специальные столбики и на их поверхность напыляли платину. Перед микроскопическими исследованиями сферы альгинат-желатин сушились в лиофильной сушке Martin Christ в течение 20 часов. Полученные после сушки образцы разрезали поперек скальпелем непосредственно перед измерением. Лиофильно высушенные образцы исследовали на сканирующих электронных микроскопах «Merlin» («Carl Zeiss», Германия) в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия» Казанского (Приволжского) федерального университета и на «AURIGA CrossBeam» («Carl Zeiss», Германия) в Нано-центре Казанского национального исследовательского технического университета им. А.Н. Туполева.

## 2.6 Метод атомно-силовой микроскопии

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) применялась для исследования морфологических характеристик поверхности ксерогелей на основе желатина, к-каррагинана и сформированного ПЭК к-каррагинан-желатина, в том числе при добавлении УНТ, с использованием атомно-силового микроскопа «TITANIUM» («NT-MDT», Россия) на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ. Измерения проводились на воздухе в полуконтактном режиме. 2 мкл образца наносили на свежесколотую поверхность слюды и сушили при комнатной температуре. Использовались стандартные кремниевые кантилеверы «NSG-10» («NT-MDT», Россия) с силовой константой 3.1-37.6 Н·м<sup>-1</sup> и резонансной частотой 140-390 кГц. Для управления микроскопом использовалась программа «Nova PX» («NT-MDT», Россия). Все изображения АСМ были

получены при комнатной температуре. Изображения обрабатывали и анализировали с помощью программы «Image Analysis» («NT–MDT», Россия).

## 2.7 Реологический метод

Реологические свойства гидрогелей на основе желатина и  $\kappa$ -каррагинан-желатина, в том числе в присутствии УНТ, исследовали с помощью реометра «Physica MCR102» («Anton Paar», Австрия). В качестве измерительной системы использована система «плита-плита» (рис. 2.4) (диаметры верхней и нижней плит 50 мм, зазор между плоскостями составлял 0.5 мм) в лаборатории теплофизики и волновых технологий ИЭПТ ФИЦ КазНЦ РАН. Объем образца в ячейке «плита-плита» составлял  $\approx 1$  мл. Температурный контроль образца осуществлялся с помощью нижней системой нагрева на элементах Пельтье P-PTD200 и активного кожуха на элементах Пельтье H-PTD200 (погрешность поддержания температуры 0.01 К).

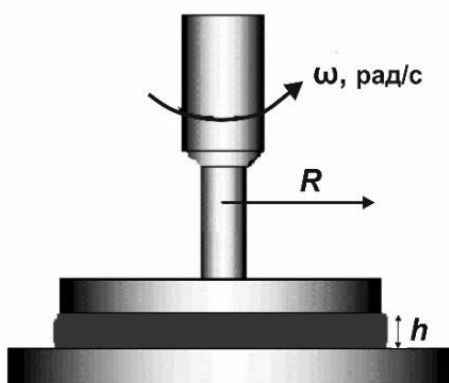


Рисунок 2.4 – Система измерительной ячейки «плита-плита».

Зависимость динамических модулей (модулей упругости ( $G'$ ) и потерь ( $G''$ )) от угловой частоты ( $\omega$ ) или от амплитуды деформаций ( $\gamma$ ), характеризующих исследуемый образец, выполнены в условиях динамического колебательного сдвига, т.е. образец подвергался синусоидальной деформации. Испытания на колебательный сдвиг можно разделить на два режима. Один режим касается

линейного вязкоупругого отклика (колебательный сдвиг малой амплитуды), а другой режим определяется путем измерения нелинейного отклика материала (колебательный сдвиг большой амплитуды) (Hyun *et al.*, 2011).

Реология колебательного сдвига с малой амплитудой представляет собой неразрушающее измерение, которое способно отслеживать временную эволюцию упругости гидрогелевых сетей во время процесса гелеобразования. Кроме того, путем проведения экспериментов с разверткой по частоте можно охарактеризовать вязкоупругое поведение гидрогелевых сетей. Динамическая вязкоупругость может быть получена путем приложения синусоидальной колебательной деформации (или напряжения) к образцу при очень малых деформациях с использованием диапазона частот. Изменения синусоидальных волн напряжения и его соответствующей деформации (или, наоборот, применения синусоидальных волн напряжения и измерения возникающих напряжений) со временем можно отслеживать, чтобы различать упругие, вязкие и вязкоупругие реакции (Tadros *et al.*, 2010).

Для того чтобы охарактеризовать реологическое поведение образца, помимо построения зависимостей динамических модулей необходимо построить зависимость напряжения сдвига от скорости сдвига, т.е. построить кривую течения (Кулезнев и др., 1988). В силу своей структуры гидрогели имеют текучее состояние при повышенных температурах. Поэтому построение классических кривых течений при температурах близких к комнатным не представляется возможным. Однако, для таких сред возможно построение кривой комплексной вязкости в режиме осцилляции.

Таким образом, в настоящей работе были исследованы гидрогели в различных состояниях: 14°C (состояние геля) и 35°C (состояние золя), на реометре в осцилляционном режиме в области линейной вязкоупругости для предотвращения разрушения образца. Интервалы параметров (величина угловой частоты ( $\omega=0.0628\dots24 \text{ c}^{-1}$ ) и размер амплитуды ( $\gamma=1\dots508 \%$ ) были подобраны таким образом, чтобы не выходить за рамки линейной вязкоупругости.

## 2.8 Кондуктометрический метод

Модификация процесса гелеобразования и электропроводящих свойств ПЭК на основе κ-каррагинана-желатина изучалась с помощью кондуктометра «InoLab Cond 7310 SET1» («WTW», Венгрия). Эксперименты проводили при охлаждении образца в температурном интервале 50-10°C. Скорость охлаждения образцов составляла 0.012°C·с<sup>-1</sup>.

Электропроводность образцов характеризовалась удельной электропроводностью  $\chi$ , соответствующей электропроводности раствора между электродами, имеющими площадь поверхности 1 см<sup>2</sup> и расположенными друг от друга на расстоянии 1 см (уравнение (2.10)):

$$\chi = \frac{1}{R} \cdot \frac{L}{q} \quad (2.10)$$

$\frac{L}{q}$  – электропроводность, См;  $L$  – расстояние между электродами, см;  $q$  – площадь поверхности электродов, см<sup>2</sup>.

## 2.9 Высвобождение биологически-активных соединений из гидрогелевой матрицы

В данной работе в качестве биологически активных веществ (БАВ) были использованы: водорастворимые витамины группы В (рибофлавин (В<sub>2</sub>) и фолиевая кислота (В<sub>9</sub>); ферменты липаза *Candida rugose* и бактериальная РНКаза биназа *Bacillus pumilus*; красители: бриллиантовый зеленый (БЗ), метиловый оранжевый (МО) и флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ).

**Приготовление гидрогелиевых сфер.** Введение инкапсулируемых БАВ осуществляется путем капельной подачи в раствор, содержащий двухвалентные катионы металлов, с мгновенным образованием сферической оболочки с включенным инкапсулируемым веществом (рис. 2.5).

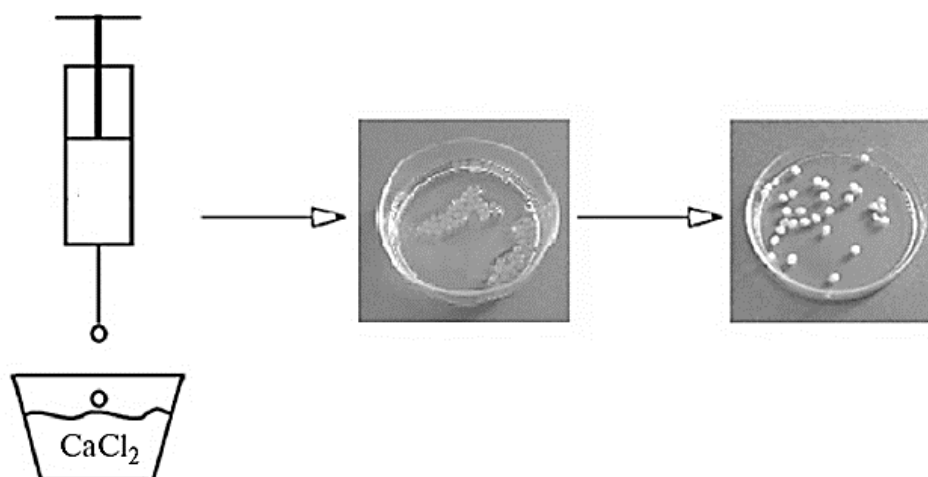


Рисунок 2.5 – Процесс формирования сфер, при добавлении гидрогеля с инкапсулируемым веществом в раствор солей двухвалентных катионов (Богданова и др., 2019).

К 400 мкл водного раствора альгината натрия добавляли 50 мкл раствора желатина или желатина-УНТ и раствора красителя в этаноле (в случае БЗ – 40 мкл с концентрацией 10 мг/мл, для МО – 25 мкл 0.1 мг/мл, для ФИТЦ – 25 мкл 4 мг/мл). В каждую систему добавляли также чистый этанол так, чтобы суммарный его объем составлял 50 мкл. Полученные растворы обрабатывали ультразвуком при 35 кГц в ультразвуковой бане «Vandelin SONOREX TK52» (Германия, 100 Вт) в течение 60 мин при 70°C. Концентрация альгината натрия в полученных растворах составляла 0.7 и 2 мас. %.

Для приготовления гидрогелевых сфер к 1.5 мл раствора  $\text{CaCl}_2$  (1 М) («х.ч.», «Татхимпродукт», Россия) при комнатной температуре из медицинского шприца (диаметр иглы 0.63 мм) по каплям при постоянном перемешивании (500 об/мин) добавляли раствор альгината натрия с соответствующим зондом. Приготовленные сферы оставляли в растворе соли на 20 мин, после чего трижды промывали буферным раствором. Альгинатные сферы получали с использованием двухвалентных катионов: цинка, бария, марганца, меди, никеля и стронция с использованием 1 М растворов соответствующих солей (в случае бария – 0.3 М).

Содержание зонда в растворе полисахарида составляло 0.6 мг для витаминов

$B_2$  и  $B_9$ , 0.4 мг для БЗ, 0.0025 мг для МО и 0.1 мг для ФИТЦ.

При исследовании удерживающей способности сферических структур в микропробирки типа «Эппендорф» («Ахуgn», США) помещали по 5 сфер и добавляли 2 мл воды. Через заданный промежуток времени отбирались аликвоты раствора для спектрофотометрического определения концентрации зонда, вышедшего из сфер в раствор.

**Приготовление полисахаридного гидрогеля.** Часть экспериментов была проведена с гидрогелем в естественном фазовом состоянии (в отличие от сфер). В этом случае к 1 мл 2 мас. % раствора альгината натрия или 1.6 мас. % к-каррагинана, содержащих соответствующий зонд (краситель, витамин или фермент), добавляли 0.5 мл 1М раствора  $CaCl_2$ , не допуская перемешивания. Полученную систему оставляли на 10 минут, после чего аккуратно сливали оставшийся над гидрогелями раствор соли. Из-за особенностей гелеобразования альгинатный гидрогель готовили при комнатной температуре, а к-каррагинановый – при охлаждении на льду. Содержание зонда в растворе полисахаридов составляло: 1 мг для липазы, 2 мг для биназы, 1 мг для витамина  $B_9$ , 0.5 мг для БЗ.

Для оценки удерживающей способности гидрогеля к объему свежеприготовленного гидрогеля, содержащего определенный зонд, добавляли 4 мл буфера. В заданные промежутки времени отбирали аликвоты, в которых спектрофотометрически определяли концентрацию зонда.

Концентрацию вышедшего зонда определяли при 23°C по поглощению:  $\lambda=623$  нм (БЗ),  $\lambda=463$  нм (МО),  $\lambda=488$  нм (ФИТЦ),  $\lambda=280$  нм (липаза),  $\lambda=280$  нм (биназа),  $\lambda=349$  нм ( $B_9$ ) и  $\lambda=446$  нм ( $B_2$ ).

Коэффициенты экстинкции зондов определяли в независимом эксперименте: 65000  $M^{-1}cm^{-1}$  (БЗ), 25000  $M^{-1}cm^{-1}$  (МО), 75000  $M^{-1}cm^{-1}$  (ФИТЦ) 26930  $M^{-1}cm^{-1}$  (биназа), 37000  $M^{-1}cm^{-1}$  (липаза), 6550  $M^{-1}cm^{-1}$  ( $B_9$ ) и 11970  $M^{-1}cm^{-1}$  ( $B_2$ ).

Для определения высвобождения зондов ( $Y$ ) использовалась формула (2.11):

$$Y = \frac{m_t}{m - m_0} \cdot 100\%, \quad (2.11)$$

где  $m_t$  – масса зонда в растворе в момент времени  $t$ ;  $m_0$  – масса зонда, оставшегося



неинапсулированным; где  $m$  – масса зонда.

В представленных расчетных результатах приведены усредненные значения трех измерений. Измерения проводили на спектрофотометре «Lambda 25» («Perkin Elmer», США) с термостатируемым кюветным отделением.

## 2.10 Флуоресцентная спектроскопия

Регистрация спектров флуоресценции триптофановых остатков в молекулах липазы и биназы использовался спектрофлуориметр «Флюорат-02-Панорама» («ЛЮМЕКС», Россия). Регистрацию проводили в диапазоне  $\lambda=310-400$  нм (через 1 нм) при длине волны возбуждения  $\lambda=295$  нм. Концентрация белка в образцах составила 0.5 мг/мл. Перед измерением образцы в кварцевых кюветах (оптический путь 1 см) термостатировали при температуре 25°C в течение 10 минут.

## 2.11 МТТ-тест

Для оценки цитотоксичности полученных биокомпозитов в качестве клеточных мишеней были выбраны клетки раковой опухоли шейки матки человека HeLa («Biolog», Россия) и аденокарциномы легких человека A549 из коллекции клеточных культур США (ATCC, CCL-185). Клетки поддерживали при 37°C в среде DMEM («Invitrogen», США) с добавлением пенициллина/стрептомицина (по 100 ед/мл) и 10% телячьей сыворотки в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки засеивали 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°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Измерение оптической плотности (ОП) осуществляли при длине волны  $\lambda=570$  нм с помощью микропланшетного фотометра «Infinite 50» («Tecan», Австрия). За 100% принимали жизнеспособность клеток в негативном контроле. Процент выживаемости клеток рассчитывали по формуле (2.12):

$$\text{Жизнеспособность(\%)} = \frac{\text{ОП обработанной группы}}{\text{ОП контрольной группы}} \cdot 100\%. \quad (2.12)$$

Цитотоксичность приготовленных систем анализировалась на кафедре микробиологии К(П)ФУ в соответствии с инструкциями производителя. Эксперименты по оценке изменений выживаемости клеток проводились тремя сериями с пятью повторностями для тестируемых вариантов в каждой.

## **2.12 Статистическая обработка результатов исследования**

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью стандартных математических методов (расчет среднеквадратичного отклонения, t-критерий Стьюдента) с использованием программного обеспечения *Origin Pro*. Критерий вероятности  $P \leq 0.05$  принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных.

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовались две основные белок-полисахаридные системы в зависимости от решаемых задач. Основные структурные исследования решались с использованием системы желатина и κ-каррагинана. Эта система была всесторонне изучена в данной работе на предмет 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.

#### 3.1. Состав стехиометричных κ-каррагинан-желатиновых комплексов

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

При введении в водный раствор желатина анионных полисахаридов – κ-каррагинана и альгината натрия происходит образование полиэлектролитных комплексов (ПЭК), вследствие взаимодействий между противоположно заряженными биополимерами. Изучение взаимодействия между биополимерами проводилось в широком диапазоне массового соотношения  $Z$  от 0 до 1 (κ-каррагинан/желатин) и от 0 до 1.2 (альгинат натрия/желатин),  $Z = \frac{C_{\text{полисах}}}{C_{\text{белок}}}$ .

Турбидиметрическое титрование позволяет фиксировать соотношение между свободными и связанными в комплекс белком и полисахаридом (Voron'ko *et al.*, 2016). На рисунках 3.1А и 3.1Б представлены зависимости оптической плотности раствора желатина при титровании его растворами полисахаридов. На

рисунках видно, что при увеличении весового соотношения биополимеров ( $Z$ ) в системе растет оптическая плотность ( $A$ ), достигая максимального значения 1.33, при  $Z = 0.8$  для  $\kappa$ -каррагинана (рис. 3.1А) и 1.22 при  $Z = 0.9$  для альгината натрия (рис. 3.1Б). При соотношении компонентов, соответствующему максимуму оптической плотности в системе образуется стехиометрический ПЭК постоянного состава. Рост оптической плотности можно объяснить увеличением концентрации ПЭК. Дальнейшее увеличение  $Z$  (увеличение концентрации полисахарида при неизменной концентрации желатина) приводит к снижению оптической плотности смесей, что является следствием образования нестехиометрических ПЭК переменного состава. При уменьшении содержания желатина в комплексе отрицательный заряд полисахарида становится некомпенсированным, в результате чего растворимость комплексов увеличивается, а оптическая плотность снижается.

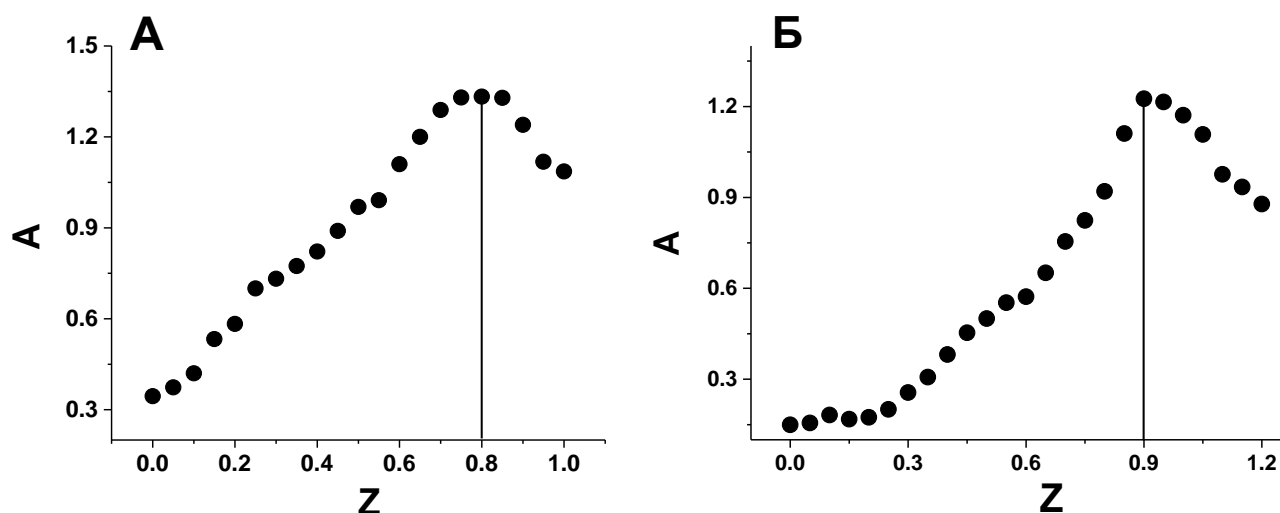


Рисунок 3.1 – Зависимость оптической плотности смесей от массового соотношения биополимеров  $Z$  при титровании водного раствора желатина ( $C_{\text{жел}} = 0.5 \%$ ,  $V = 10$  мл) водными растворами (А)  $\kappa$ -каррагинана и (Б) альгината натрия при  $T=23$  °С,  $\lambda = 400$  нм.

Согласно полученным результатам методом турбидиметрического титрования было определено массовое соотношение биополимеров  $Z \approx 0.8$  ( $\kappa$ -каррагинан/желатин) и  $Z \approx 0.9$  (альгинат натрия/желатин), при которых растворы

биополимеров содержат только стехиометрические ПЭК, а содержание несвязанных биополимеров практически стремится к нулю.

С учетом полученных результатов дальнейшие эксперименты проводились с системами, содержащими стехиометричные белок-полисахаридные комплексы.

### **3.2 Структурный анализ к-каррагинан-желатиновых комплексов, в том числе модифицированных углеродными нанотрубками**

В настоящее время в структурных исследованиях биополимерных систем активно применяются методы малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и порошковой рентгеновской дифракции (ПРД), результаты которых дополняются данными сканирующей электронной (СЭМ) и атомно-силовой (АСМ) микроскопии (Petoukhov *et al.*, 2012; Bordas *et al.*, 1983; Koch *et al.*, 1989).

Данный раздел работы посвящен изучению биополимерных гидрогелей на основе желатина и к-каррагинана в двух состояниях: золя ( $T=35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и геля ( $T=14\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), а также варианты этих систем, модифицированных УНТ. Таким образом, планировалось провести сравнительное исследование структуры гидрогеля в двух агрегатных состояниях (гель и золь), а также оценить возможные структурные изменения в присутствии углеродных нанотрубок.

#### **3.2.1 Анализ фазового состояния сконструированных систем методом порошковой рентгеновской дифракции**

Исследование с помощью порошковой рентгеновской дифракции (ПРД) является эффективным инструментом для изучения аморфной и кристаллической структуры полимеров. Изучение структуры растворов желатина и к-каррагинана в индивидуальном виде и в составе композитного гидрогеля с добавлением УНТ изучались дифрактометрическим методом в процессе естественного высыхания гелей на поверхности кремниевой пластинки.

Как правило, присутствие кристаллической фазы в материалах сильно влияет на их механические свойства. Учитывая же, что для всех трех компонент образцов

характерны близкие межатомные расстояния (длины связей), в случае их аморфной природы следует ожидать достаточно близкой дифракционной картины.

Согласно данным ПРД, УНТ и желатин являются наноструктурированными образцами, а к-каррагинан образует достаточно стабильную кристаллическую фазу (рис. 3.2А).

Широкий пик на дифрактограмме желатина при значении  $2\theta = 20^\circ$  определяется как «аморфное гало» и соответствует аморфной природе желатина (рис. 3.2А) (Zhuang *et al.*, 2015; Padhi *et al.*, 2016). Дифрактограмма к-каррагинана продемонстрировала отчетливые пики в диапазоне углов  $2\theta = 15^\circ$ - $25^\circ$ , указывающие на его кристалличность (рис. 3.2А), а характерный пик  $2\theta = 20^\circ$  так же соответствует аморфной слабоупорядоченной компоненте биополимера (Agarwal *et al.*, 2016).

На рисунке 3.2 А представлена и типичная рентгенограмма УНТ. Самый сильный дифракционный пик  $2\theta = 27^\circ$  может быть определен как отражение (002) гексагональной структуры графита (Xie *et al.*, 2010; Saleh *et al.*, 2011). Другие характерные дифракционные пики графита в области углов дифракции  $2\theta$  равных  $44^\circ$ ,  $53^\circ$  и  $78^\circ$  связаны с дифракцией от семейств плоскостей (100), (004) и (110) соответственно (Saleh, 2013).

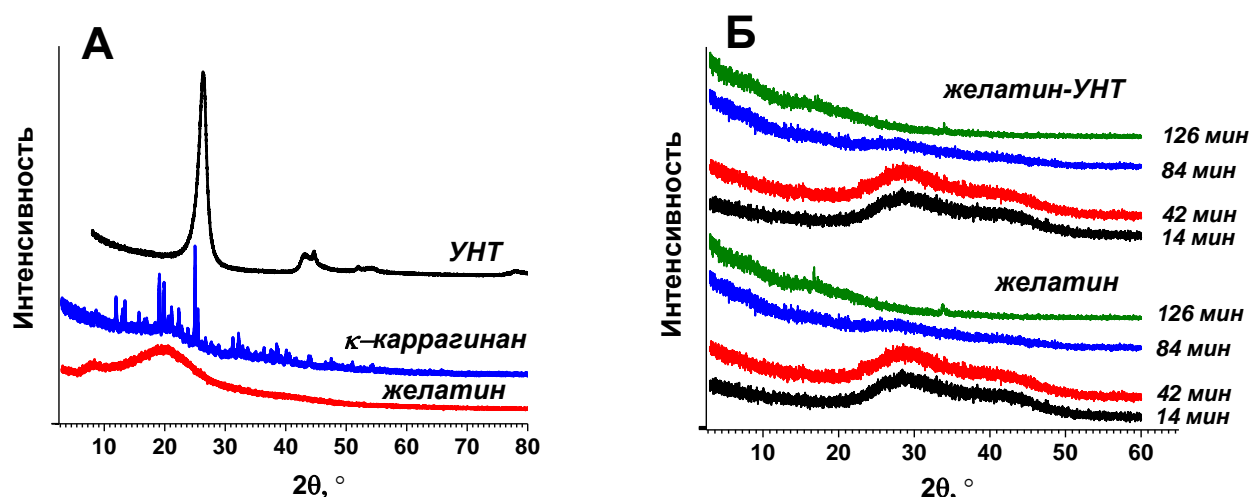


Рисунок 3.2 – Рентгеновские дифрактограммы (А) сухих компонентов гелей: желатина, к-каррагинана и УНТ; (Б) гелей исходного желатина и желатин-УНТ, полученные в процессе их естественного высыхания.

Для всех исследованных образцов в жидком и гелеобразном состоянии характерна однотипная картина дифракции в виде двух сильно уширенных аморфных гало, соответствующих средним межатомным расстояниям в них. Похожие дифракционные картины можно наблюдать при исследовании других комплексов, например, в смесях к-каррагинан-агар (Rhim *et al.*, 2013) и ι-каррагинан-желатин (Padhi *et al.*, 2016).

По мере высыхания растворов и гелей происходит вырождение этих пиков в небольшой уширенный пик в области  $2\theta = 10-15^\circ$ . Низкая интенсивность связана с малым количеством рассеивающего вещества, полученного после высыхания гелей.

При этом возникают небольшие пики, соответствующие малым количествам кристаллической фазы, которая может соответствовать неорганической или органической низкомолекулярной компоненте. Так, на дифрактограммах желатина (рис. 3.2Б) наблюдаются несколько пиков в области углов  $2\theta = 17^\circ$  и  $35^\circ$ . В виду малого их числа идентификация была затруднительна и не проводилась.

Добавление УНТ в желатин не меняет исходную аморфную дифракционную картину (рис. 3.2Б). При этом в процессе высыхания образца (геля) пиков кристаллическости наблюдается меньшее количество, а на финальной стадии они исчезают вовсе, что указывает на возможное подавление процессов сегрегации компонентов системы при добавлении УНТ. Это может быть связано и с адсорбирующей способностью УНТ в подобных случаях. Так и или иначе, но кристаллизации каких-либо компонент, как в данном случае, так и в двух следующих, как будет показано, не наблюдается.

Проведенные эксперименты в реальном временном масштабе с к-каррагинановым гелем свидетельствуют о том, что на финальных стадиях разрушения геля и формирования пленки на поверхности кремниевой пластинки на фоне аналогичных предыдущему изменений картины аморфных пиков, происходит кристаллизация одной из присутствующих компонент (рис. 3.3А). Поиск по базе данных порошковой дифрактометрии PDF-2 (ICDD PDF-2, Release 2005-2009) указывает, что этой кристаллической компонентой является хлорид

калия в форме сильвита (Sylvite, KCl, syn, Ref.code 01-073-0380), который используется при формировании гелей и стандартно входит в состав исходного образца. На рисунке 3.3А пики, соответствующие этой фазе, показаны вертикальными линиями красного цвета (отметим, что одна из линий на  $2\theta = 40.5^\circ$  не наблюдается на экспериментальной дифрактограмме, что связано с текстурированием образца в процессе высыхания геля и кристаллизации). Добавление УНТ также подавляет в заметной степени кристаллизацию неорганической компоненты, что отражается в уменьшении интенсивности их интерференционных пиков в смешанном образце (рис. 3.3А) (Abdulrazzak *et al.*, 2019).

Системы к-каррагинан-желатин и к-каррагинан-желатин-УНТ в состоянии геля характеризуются одинаковым типом дифракционной картины в виде двух сильно уширенных аморфных гало (рис. 3.3Б), соответствующих средним межатомным расстояниям. В процессе сушки образца пики вырождаются в один небольшой уширенный пик в интервале  $2\theta = 10-15^\circ$ . Его низкая интенсивность связана с небольшим количеством рассеивающего вещества, полученного после сушки геля. Добавление УНТ в гидрогель не изменяет исходную дифракционную картину аморфного образца.

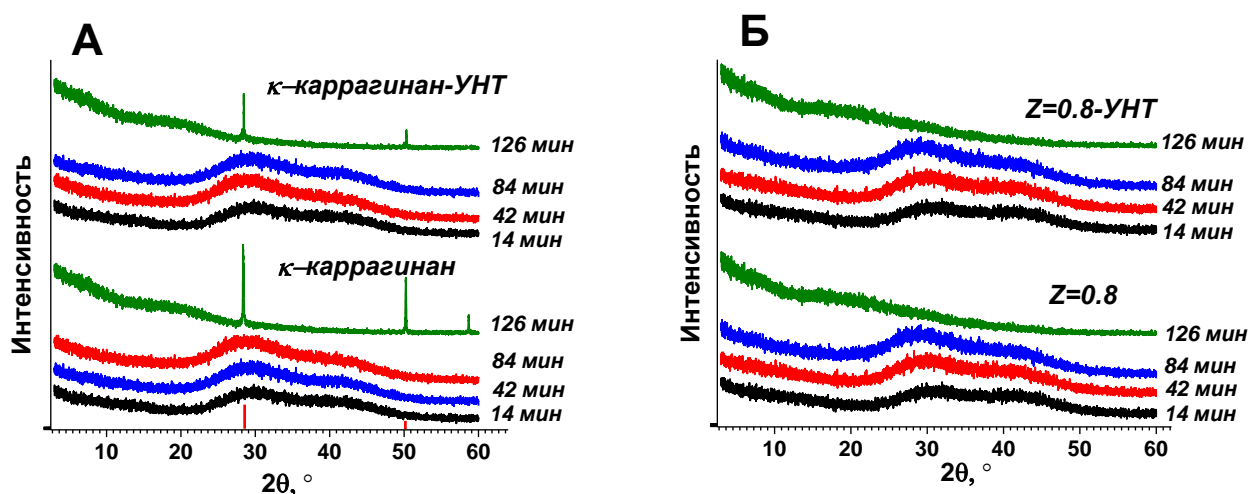


Рисунок 3.3 – Рентгеновские дифрактограммы образцов геля на основе (А) к-каррагинана и к-каррагинана-УНТ; (Б) к-каррагинан-желатина ( $Z=0.8$ ) и  $Z=0.8$ -УНТ, полученные в процессе естественного высыхания образцов.



Присутствие в образце и полисахарида и белка оказывает благоприятное влияние на фазовую структуру образца, так что не наблюдается кристаллизации ни одной из ранее присутствующих кристаллизующихся компонент (рис. 3.3Б). Это косвенно указывает на факт гомогенизации системы, а не выделение отдельных компонент в индивидуальные ассоциаты (Yang *et al.*, 2009). Интеграция полисахарида и белка в композитный гидрогель приводит к подавлению их индивидуальной структуры и образованию интегральной супрамолекулярной структуры, очевидно определяемой ПЭК.

При этом добавление УНТ оказывает еще более стабилизирующий эффект. Сравнение картин дифракции с сухими исходными образцами (рис. 3.2А) указывает на факт гомогенизации подобных систем. Несмотря на наличие крупных частиц УНТ, которые визуальнo наблюдаются во всех образцах, их присутствие не обнаруживается в дифракционных картинах гидрогеля (рис. 3.3Б). Фазовая однородность изученных систем, подтвержденная методом ПРД, не исключает процессы агрегации и сегрегации в образцах на всех масштабных уровнях, которые, в свою очередь, могут быть оценены в иерархическом порядке с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния, атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии (Ahlqvist *et al.*, 2006; Mattiasson *et al.*, 2005; Зуева и др., 2020).

### **3.2.2 Структурные характеристики гидрогелей по данным малоуглового рентгеновского рассеяния**

Метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) ориентирован на получение информации о надмолекулярном уровне организации гелеобразующих белок-полисахаридных систем, а именно о размерах статических неоднородностей в изучаемых системах в состояниях геля и золя с учетом влияния УНТ.

Для анализа морфологии областей негомогенности (далее частиц) в данных системах из кривых МУРР были рассчитаны структурные параметры, которые последовательно рассматриваются для данных образцов. Анализ

экспериментальных данных выполнен после предварительной обработки экспериментальных кривых рассеяния, связанных с учетом поглощения образцов, вычитания фонового рассеяния капилляра с водой и калибровки интенсивности рассеяния кривых на интенсивность рассеяния эталоном (аморфный графит). В результате интегрирования двумерных картин МУРР (рис. 3.4) для всех исследованных образцов получены одномерные кривые рассеяния. Достаточно высокая интенсивность рассеяния свидетельствует о неоднородности (микронеоднородности) образцов – наличии произвольно ориентированных рассеивающих частиц (зон повышенной плотности), порядок размеров которых соответствует информационной области метода МУРР (1–100 нм) (Guinier *et al.*, 1955).

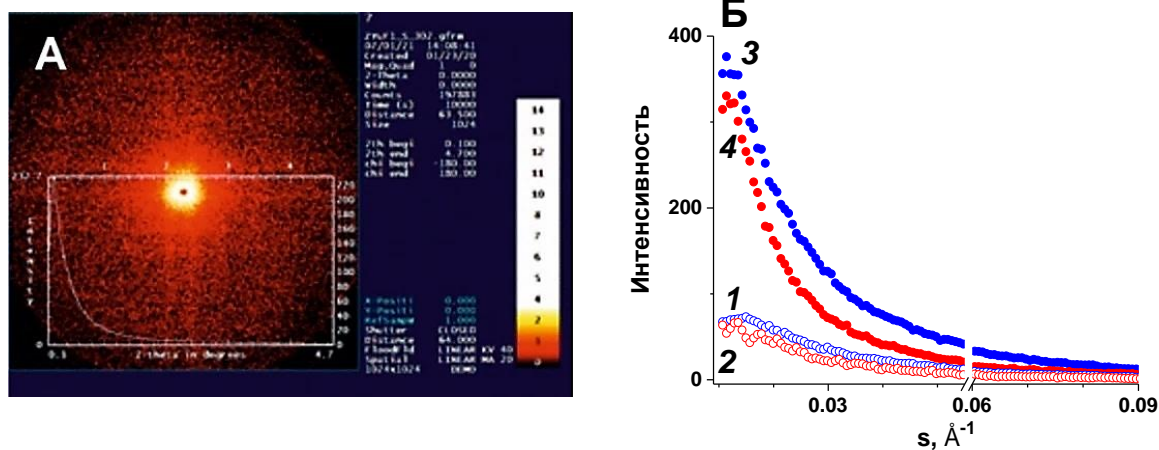


Рисунок 3.4 – (А) Двумерная картина МУРР гидрогеля κ-каррагинан-желатин ( $Z=0.8$ ) при  $T = 14^{\circ}\text{C}$ ; (Б) зависимость интенсивности МУРР от вектора рассеяния  $s$  для  $Z=0.8$ : 1 –  $14^{\circ}\text{C}$ , 2 –  $35^{\circ}\text{C}$ ;  $Z=0.8$ -УНТ: 3 –  $14^{\circ}\text{C}$ , 4 –  $35^{\circ}\text{C}$  ( $s = 4\pi\sin\theta/\lambda$ , где  $\lambda$  - длина волны падающего рентгеновского луча).

В связи с тем, что для оценки размерных и структурных параметров систем из данных МУРР широко используются две важные аппроксимации экспериментальных данных, основанные на уравнениях Гинье и Порода, условно кривые МУРР можно разбить на два соответствующих участка – область выполнения уравнения Гинье (ближняя к первичному пучку часть кривых) и Порода (среднеугловая часть кривых) (рис. 3.5). Каждый их участков ответственен

за получение соответствующих структурных параметров, которые будут обсуждаться далее в процессе анализа.

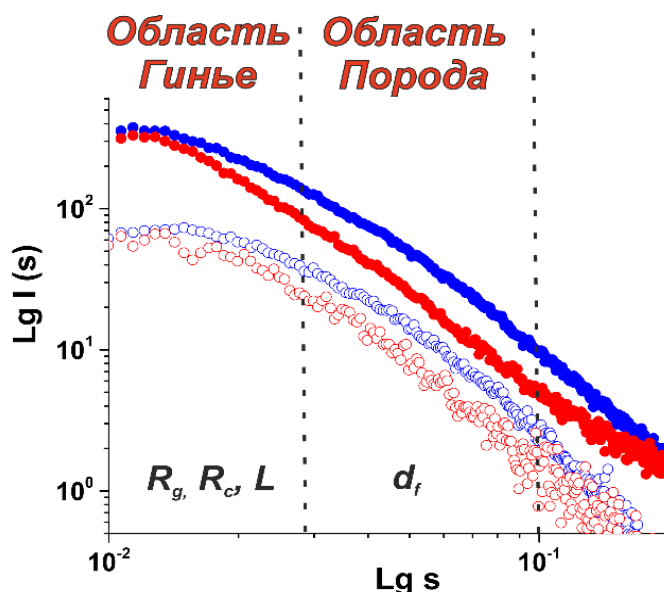


Рисунок 3.5 – Кривые интенсивности рассеяния и области определения соответствующих параметров исследуемых систем.

Как можно видеть из представленных графиков (рис. 3.6А,Б), изменение вида кривых интенсивности МУРР с температурой вполне закономерно, так как при 35°C происходит нарушение надмолекулярной структуры геля, «разбухание» молекулярных клубков и уменьшение электронного контраста между компонентами системы, что приводит к уменьшению интегральной интенсивности МУРР и появлению более крупных взаимодействующих агрегатов, что особенно заметно для образцов желатина и к-каррагинана в состоянии золя.

Отметим, что для комбинированного гидрогеля к-каррагинан-желатин характерно более интенсивное малоугловое рассеяние (рис. 3.6В), что связано с участием обоих компонент в формировании объединенной супрамолекулярной структуры на основе ПЭК. При этом в комбинированном геле наблюдаются минимальные изменения вида кривых МУРР при повышении температуры системы, что в определенной степени указывает на стабилизирующее воздействие обоих компонент.

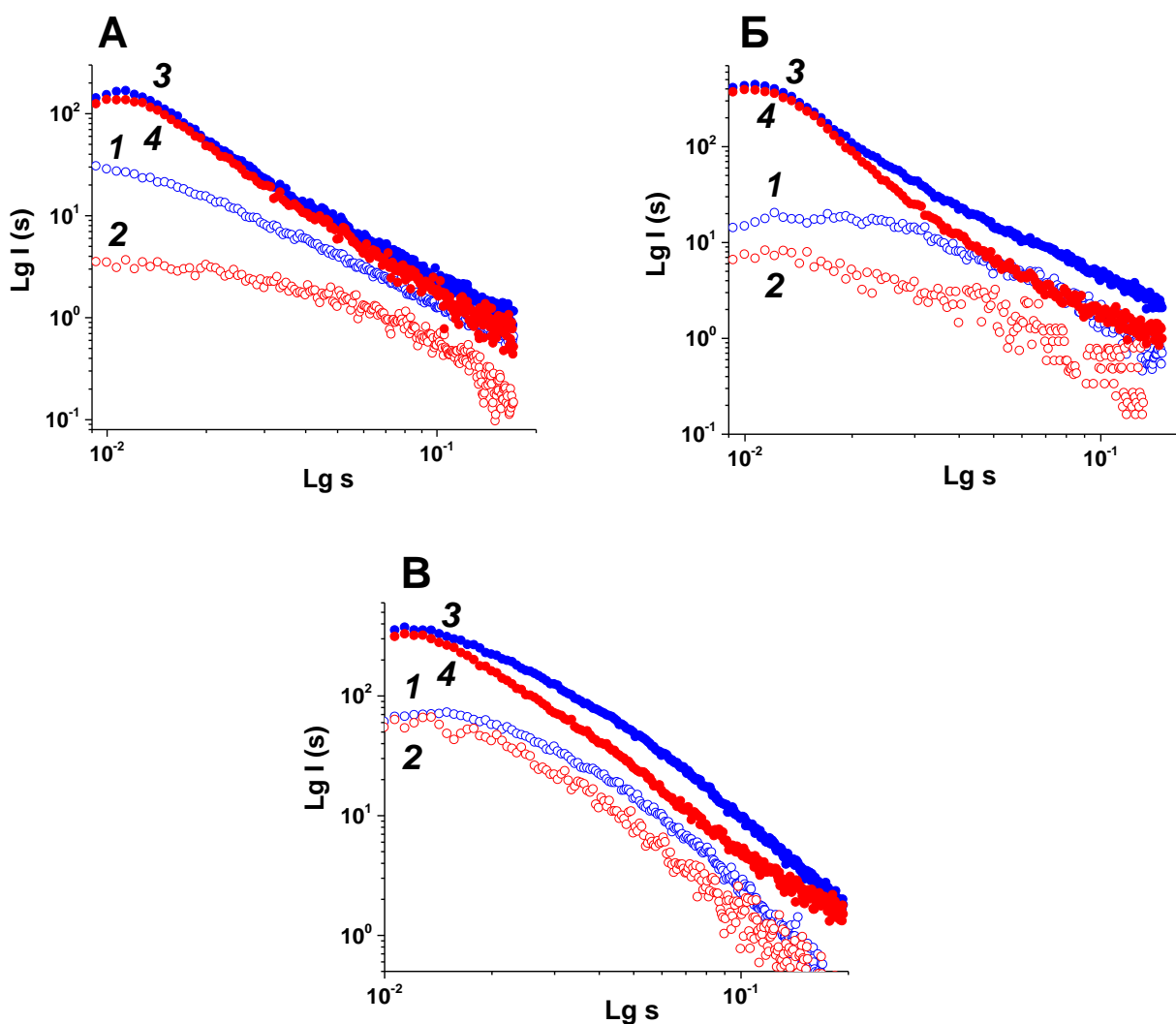


Рисунок 3.6 – Интенсивность МУРР в двойном логарифмическом масштабе: (А) желатин: 1 –14°C, 2 –35°C; желатин-УНТ: 3 – 14°C; 4 – 35°C; (Б) κ-каррагинан: 1 – 14°C, 2 –35°C; κ-каррагинан-УНТ: 3 – 14°C, 4 – 35°C; (В) Z=0.8: 1 – 14°C, 2 – 35°C; Z=0.8-УНТ: 3 – 14°C, 4 – 35°C.

Можно полагать, что образование дополнительных физических зацеплений между тройными спиралью желатина и двойными спиралью κ-каррагинана является причиной стабилизации κ-каррагинан-желатинового геля даже в состоянии золя (35°C). При добавлении УНТ во всех исследуемых системах наблюдается значительное увеличение интенсивности МУРР, особенно в области низких значений  $s$ , что в целом свидетельствует как об увеличении числа рассеивающих центров, так и о присутствии в образцах достаточно крупных рассеивающих объектов. Характерный вид кривых интенсивности рассеяния слабо

изменяется с ростом температуры, что свидетельствует о сохранении супрамолекулярной структуры системы при добавления УНТ (рис. 3.6).

Для анализа морфологии изученных систем на основе экспериментальных данных МУРР был рассчитан ряд параметров и размерных характеристик. Одной из важных характеристик, получаемых из экспериментальных данных МУРР, является радиус инерции частиц  $R_g$  (Guinier *et al.*, 1955). Этот параметр представляет собой среднеквадратичное расстояние всех источников рассеяния от центра частицы. По величине  $R_g$  можно судить о размере макромолекулярного или супрамолекулярного агрегата. Радиус инерции частиц  $R_g$  определялся двумя способами. Первый основан на использовании приближения Гинье, которое справедливо при условии  $(sR_g) < 1.3$  (рис. 3.7, табл. 3.1). Второй способ – оценка  $R_g$  из функции распределения расстояний  $P(r)$ . Так, предполагая сферическую форму частиц, можно рассчитать из  $R_g$  эффективный средний радиус частиц  $R_{sph}$  (табл. 3.1), используя выражение  $R_{sph} = \sqrt{\frac{5}{3}} R_g$  (Guinier *et al.*, 1955).

Для всех исследуемых систем: желатин (рис. 3.7А), к-каррагинан (рис. 3.7Б), Z=0.8 (рис. 3.7В) характерно увеличение значения  $R_g$  при температуре 35 °С, при котором образец находится в состоянии золя, что указывает на перестройку и агрегацию биополимерных цепей (табл. 3.1). Присутствие УНТ приводит к увеличению  $R_g$  как в состоянии геля, так и золя, что является следствием присутствия в образцах достаточно крупных рассеивающих объектов в виде наночастиц.

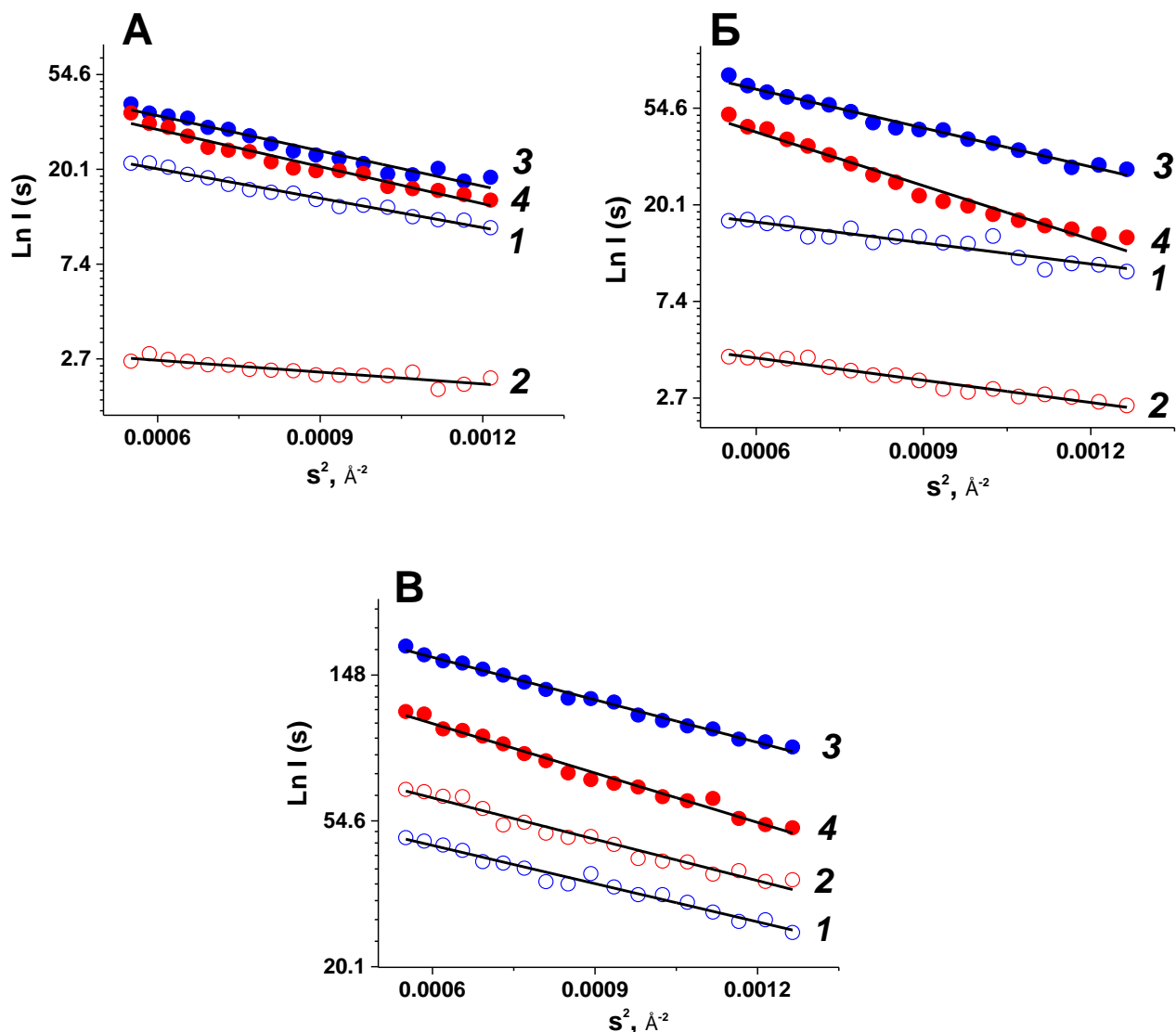


Рисунок 3.7 – Линейные участки графика Гинье, использованные для определения радиуса инерции  $R_g$ , для: (А) желатин: 1 – 14°C, 2 – 35°C; желатин-УНТ: 3 – 14°C; 4 – 35°C; (Б) κ-каррагинан: 1 – 14°C, 2 – 35°C; κ-каррагинан-УНТ: 3 – 14°C, 4 – 35°C; (В) Z=0.8: 1 – 14°C, 2 – 35°C; Z=0.8-УНТ: 3 – 14°C, 4 – 35°C.

На начальной стадии определения структурных параметров исследованных систем по экспериментальным данным МУРР вполне логичным представлялось предположение о сферической симметрии образующихся агрегатов, причем радиус подобных сферических частиц вполне однозначно вычислялся из полученных значений радиусов инерции частиц  $R_g$ , предполагая эти частицы однородными и с гладкой поверхностью. Впоследствии сравнение полученных значений  $R_g$  с рассчитанными максимальными расстояниями  $D_{max}$  в частицах (табл. 3.1)

позволило определить форму частиц как заметно отклоняющуюся от сферической – вытянутую (цилиндрическую) форму (рис. 3.8).

На основе имеющихся данных (Derkach *et al.*, 2018), можно предположить, что основной размерный масштаб и его форму в структуре гидрогеля будут определять существенно бóльшие по сравнению с желатином молекулы к-каррагинана. Благодаря своей гибкости полисахаридные цепи могут образовывать большое количество контактов с молекулами желатина. Зоны контактов имеют жесткую стержнеобразную форму, что приводит к образованию анизотропной структурной сети, которую гипотетически можно рассматривать как вытянутые частицы между узлами.

Такая высокоанизотропная система может быть смоделирована как ансамбль цилиндрических частиц со средней длиной  $L$  (уравнение 3.1) и радиусом инерции сечения  $r_c$  ( $r_c = \sqrt{\frac{5}{3}} R_c$ ), полученных с помощью модифицированных графиков Гинье ( $\ln(s \cdot I(s))$  vs  $s^2$ ) (рис. 3.8) (Wang *et al.*, 2013):

$$L = \sqrt{12 \cdot (R_g^2 - R_c^2)}. \quad (3.1)$$

Полученные в рамках цилиндрической модели частиц параметры представлены в таблице 3.1 и изображены на рисунке 3.8. Наши данные показывают, что добавление УНТ не изменяет тип получаемой супрамолекулярной структуры, увеличивая только размер частиц с ростом температуры. Добавление УНТ лишь несколько увеличивает размеры агрегатов, а именно, радиуса поперечного сечения цилиндрических частиц  $R_c$  и особенно длины цилиндрических частиц  $L$  по сравнению с «чистыми» гелями. Стохастические клубки молекул желатина (рис. 3.8), как и ожидалось не давали участка с положительным наклоном на модифицированном графике Гинье делая невозможным расчет радиуса поперечного сечения  $R_c$ .

Таблица 3.1 – Структурные параметры гидрогелей при добавлении УНТ

Образец	T, °C	Анализ Гинье					P(r)		$d_f$
		$R_g, \text{Å}$	$R_{sph}, \text{Å}$	$R_c, \text{Å}$	$r_c, \text{Å}$	$L, \text{Å}$	$R_g, \text{Å}$	$D_{max}, \text{Å}$	
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
Z=0.8	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
Z=0.8-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

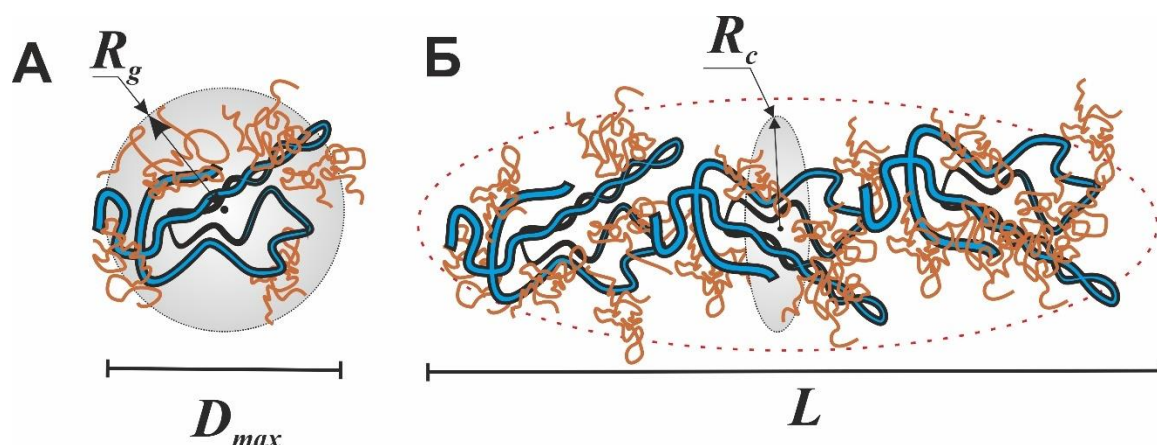


Рисунок 3.8 – Схематическое изображение (А) сферической и (Б) цилиндрической моделей с искомыми параметрами.

Дополнительно из двойной логарифмической зависимости интенсивности и угла рассеяния в диапазоне средних значений волнового вектора (рис. 3.5) можно оценить фрактальную размерности частиц  $d_f$ , которая характеризует «гладкость» поверхности частицы. Понятие фрактала введено для объектов сложной конфигурации, которые не могут быть измерены в стандартном масштабе длины. Отметим, что в литературе принято рассматривать биополимерные системы как



фрактальные объекты на различных стадиях формирования (Schaefer *et al.*, 1984; Brinker *et al.*, 1990). Принято считать (Schaefer *et al.*, 1988), что значение  $d_f$ , близкое к 1, отражает линейные структуры, значения  $d_f$  около 2 характеризуют «гладкую» поверхность набухших гелей, а для разветвленных сетей наблюдается увеличение фрактальной размерности до 3. Полученные значения  $d_f$  (табл. 3.1) соответствуют физически сшитым гелям, демонстрирующим характер, демонстрирующим поведение рассеяния, близкое к полимерным клубкам, набухшим в хорошем растворителе (Hung *et al.*, 2015). Присутствие УНТ несколько стабилизирует гидрогелевую сеть.

Достаточно показательным, с точки зрения оценки морфологии систем и типа супрамолекулярных структур является вид графиков Кратки, которые так же широко используются для характеристики структуры гидрогелей (Wei *et al.*, 2021). Вид кривых в форме зависимости  $s^2I(s)$  от  $s$  является качественной оценкой степени складчатости или компактности макромолекул. Анализ вида зависимостей позволяет различить рассеяние от стержнеобразных надмолекулярных структур, гауссовых цепочек и объемных структур, представляющих собой массовые фракталы. Например, линейная форма зависимости интенсивности рассеяния при больших значениях вектора  $s$  на графиках Кратки характеризует рассеяние от стержнеподобных структур. Графики Кратки с интенсивностями, монотонно возрастающими с  $s$  и достигающими значения плато при больших  $s$ , указывают на рассеяние от гауссовых цепочек. А рассеяние от фрактальной трехмерной структуры показывает отчетливый пик на графиках Кратки (рис. 3.9).

Графики Кратки для желатина и κ-каррагинана в состоянии золя и геля (рис. 3.9А,Б) имеют колоколообразную форму, характерную для картины рассеяния от системы плотно свернутых глобул. Вид кривых на графике Кратки для модифицированных УНТ образцов желатины и κ-каррагинана соответствует рассеянию от стержнеобразных надмолекулярных структур. Для гидрогелей Z=0.8 при всех исследованных температурах полученные вид кривых рассеяния почти идентичны (рис. 3.9В). Очевидно, что образование надмолекулярной структуры

комбинированных гелей происходит при совместном участии индивидуальных компонентов.

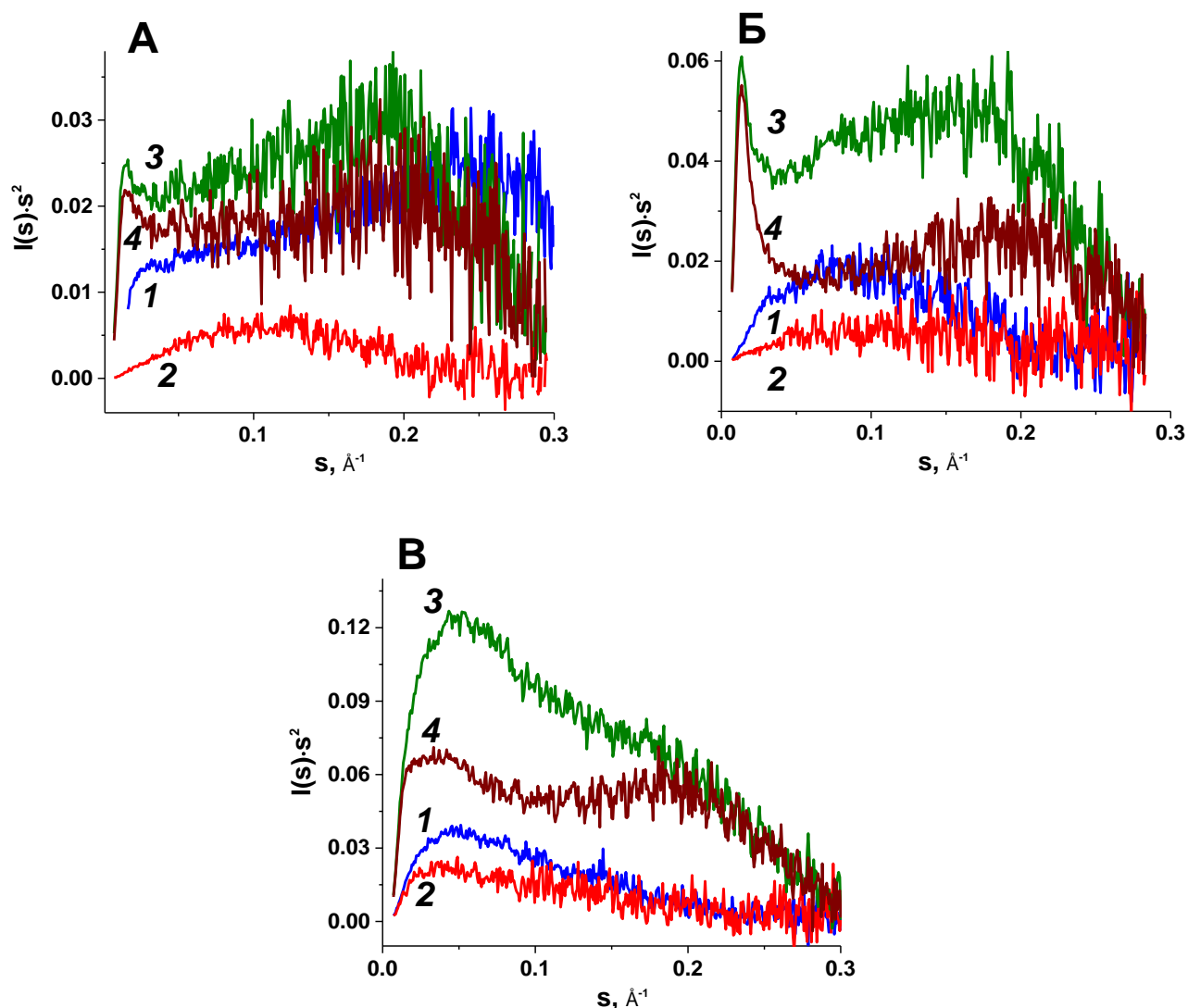
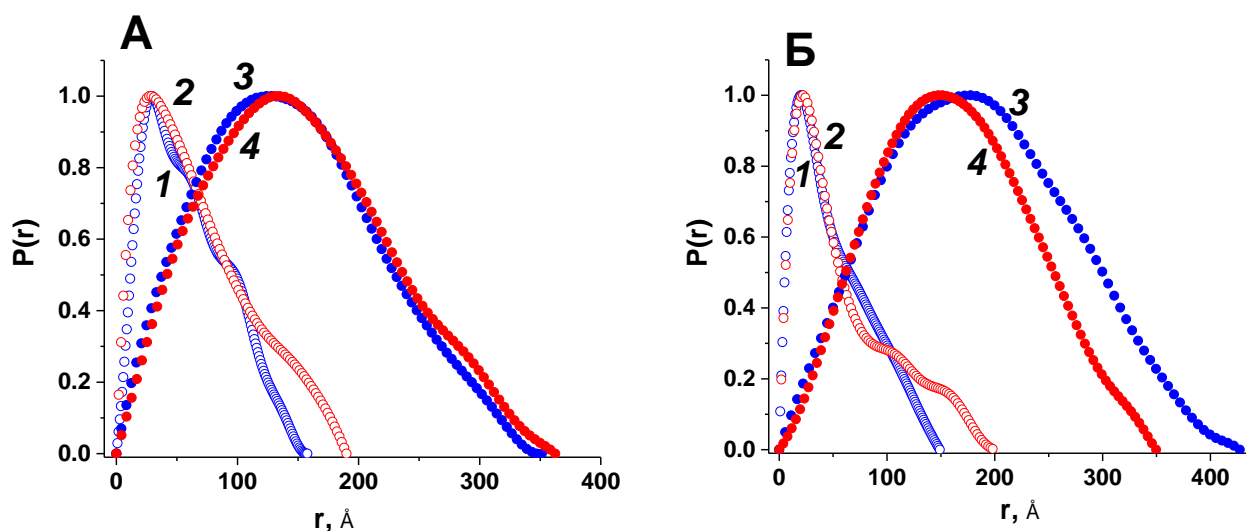


Рисунок 3.9 – Графики Кратки для исследуемых систем: (А) желатин: 1 – 14°C, 2 – 35°C; желатин-УНТ: 3 – 14°C; 4 – 35°C; (Б) κ-каррагинан: 1 – 14°C, 2 – 35°C; κ-каррагинан-УНТ: 3 – 14°C, 4 – 35°C; (В) Z=0.8: 1 – 14°C, 2 – 35°C; Z=0.8-УНТ: 3 – 14°C, 4 – 35°C.

УНТ присутствуют во всех образцах, что, естественно, приводит к увеличению интенсивности вблизи  $s \rightarrow 0$ , т.к. размерные характеристики УНТ заметно больше зоны информации метода МУРР. Повышение и понижение температуры не приводит к заметным изменениям хода кривых.

Сравнение экспериментальных кривых рассеяния в рамках различных структурных моделей, а также их сопоставление с литературными данными позволило выделить несколько вариантов, которые дают наиболее эффективное описание экспериментальных данных с адекватным и ясным физическим смыслом. В частности, моделирование кривых рассеяния программой *PRIMUS* в рамках глобулярной модели с локальным монодисперсным окружением позволяет определить функцию распределения расстояний  $P(r)$  между рассеивающими центрами в частице, которая содержит ценную информацию о форме и размере макромолекулярных ассоциатов (рис. 3.10). Значение  $P(r) = 0$ , если  $r > D_{max}$  (максимальный характерный размер частицы), что позволяет оценить  $D_{max}$  по экспериментальным данным, используя так называемые косвенные методы трансформации (Da Vela *et al.*, 2020). Форма функций  $P(r)$  предоставляет информацию об общей форме частицы и дает независимый способ определения  $R_g$ . При этом радиус инерции  $R_g$ , определенный с помощью кривой  $P(r)$ , которая, в свою очередь, вычисляется по всей экспериментальной кривой интенсивности рассеяния, оказывается значительно более устойчивой оценкой к наличию примеси полидисперсных частиц, чем величина  $R_g$  по графику Гинье.



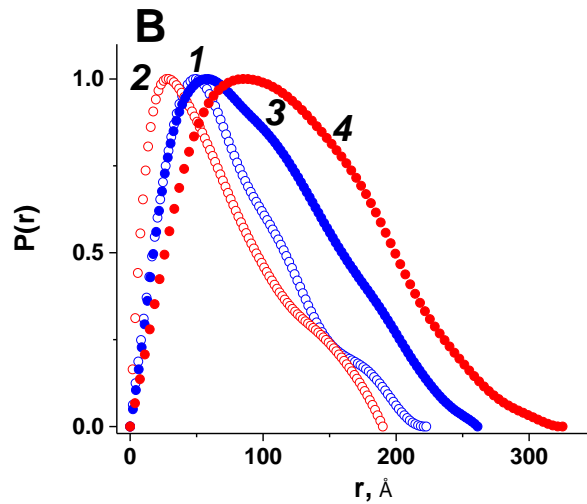


Рисунок 3.10 – Нормированные функции распределения расстояний  $P(r)$  для исследуемых систем: (А) желатин: 1 – 14°C, 2 – 35°C; желатин-УНТ: 3 – 14°C; 4 – 35°C; (Б) κ-каррагинан: 1 – 14°C, 2 – 35°C; κ-каррагинан-УНТ: 3 – 14°C, 4 – 35°C; (В) Z=0.8: 1 – 14°C, 2 – 35°C; Z=0.8-УНТ: 3 – 14°C, 4 – 35°C.

Все полученные графики были нормированы на максимальное значение  $P(r)$  (рис. 3.10). Во всех исследуемых системах наблюдается ассиметричный вид кривых, характерный для анизометричных частиц, а присутствие УНТ приводит к значительному увеличению  $D_{max}$ . Добавление УНТ в исходные образцы приводит к эволюции распределения  $P(r)$  (рис. 3.10). Координата максимума смещается к большим значениям, соответствуя увеличенным значениям  $R_g$  наблюдаемых объектов. Такое изменение свидетельствует о превращении плотных компактных глобул в рыхлые (клубкообразные) полимерные структуры (Teraoka, 2002). При этом, значения  $R_g$  в модифицированных УНТ системах оказываются значительно ниже значений  $D_{max}/2$  для всех исследуемых систем. Этот факт указывает на то, что частицы в действительности не являются сферическими, а скорее приближаются к вытянутой цилиндрической форме (рис. 3.8). Значения  $R_g$ , рассчитанные с использованием функции  $P(r)$ , хорошо согласуются с оценками  $R_g$  по графику Гинье (табл. 3.1). Таким образом, используемое при вычислении функции распределения по расстояниям  $P(r)$  предположение о монодисперсном окружении сферических частиц оказывается не совсем корректным. По-видимому,

биополимеры адсорбируются на поверхности УНТ с образованием удлиненных анизометричных частиц.

Для извлечения структурной информации из экспериментальных данных можно использовать различные эмпирические модели. Полученные значения  $R_g$  и  $R_c$  для исследуемых образцов (табл. 3.1) были использованы при моделировании структуры гидрогеля с помощью стандартных структурных моделей, входящих в программные пакеты «SAXSView». Эти модели основаны на сочетании известных закономерностей в кривых распределения интенсивности МУРР, например, как это представлено в модели *Beaucage* (Hammouda *et al.*, 2010), и позволяют получить соответствующие значения  $R_{sph}$  и  $r_c$ , а также ряд других параметров. Мы проанализировали значительное количество моделей, представленных в этих программах, чтобы выбрать адекватную физическую модель для наших систем.

Анализ литературных данных о структуре гелей, в том числе на основе желатина и к-каррагинана (Fontes-Candiaa *et al.*, 2020) свидетельствует о том, что наиболее часто используемыми моделями, имеющими ясный физический смысл, являются модели цилиндрических частиц в гелях (Yuguchi *et al.*, 2002; McAulay *et al.*, 2020) и модели геля Гаусса-Лоренца (G-L) (Evmenenko *et al.*, 2001). Результаты моделирования экспериментальных кривых рассеяния в рамках данных моделей и полученные нами при моделировании размерные характеристики исследованных систем приведены в таблице 3.2, а на рисунках 3.11, 3.12 и 3.13 представлены графические характеристики исследуемой системы при моделировании экспериментальных данных малоуглового рентгеновского рассеяния в рамках модели геля Гаусса-Лоренца и цилиндрических частиц, соответственно. Отметим, что параметр Гаусса ( $\Xi$ ) представляет собой средний характерный размер статических корреляций в системе (средний размер ПЭК), тогда как параметр Лоренца ( $\xi$ ) является средней длиной динамических колебаний полимерных цепей между сшивками, т.е. фактически средним размером сшивок. (Evmenenko *et al.*, 2001) (рис. 3.11).

Таблица 3.2 – Моделирование формы частиц в белок-полисахаридных гидрогелях при добавлении УНТ в модели цилиндрических частиц в гелях и модели геля Гаусса-Лоренца

Образец	Т, °С	<i>Гаусс-Лоренц гель</i>		<i>Цилиндр</i>	
		$\Xi, \text{Å}$	$\xi, \text{Å}$	$R_c, \text{Å}$	$L, \text{Å}$
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
Z=0.8	14	64.3	29.2	18.5	2588.4
	35	100	38	25.9	3772.7
Z=0.8-УНТ	14	86.8	29.7	24.8	3069.6
	35	122	44.3	33.4	6324.5

## Растворы биополимеров

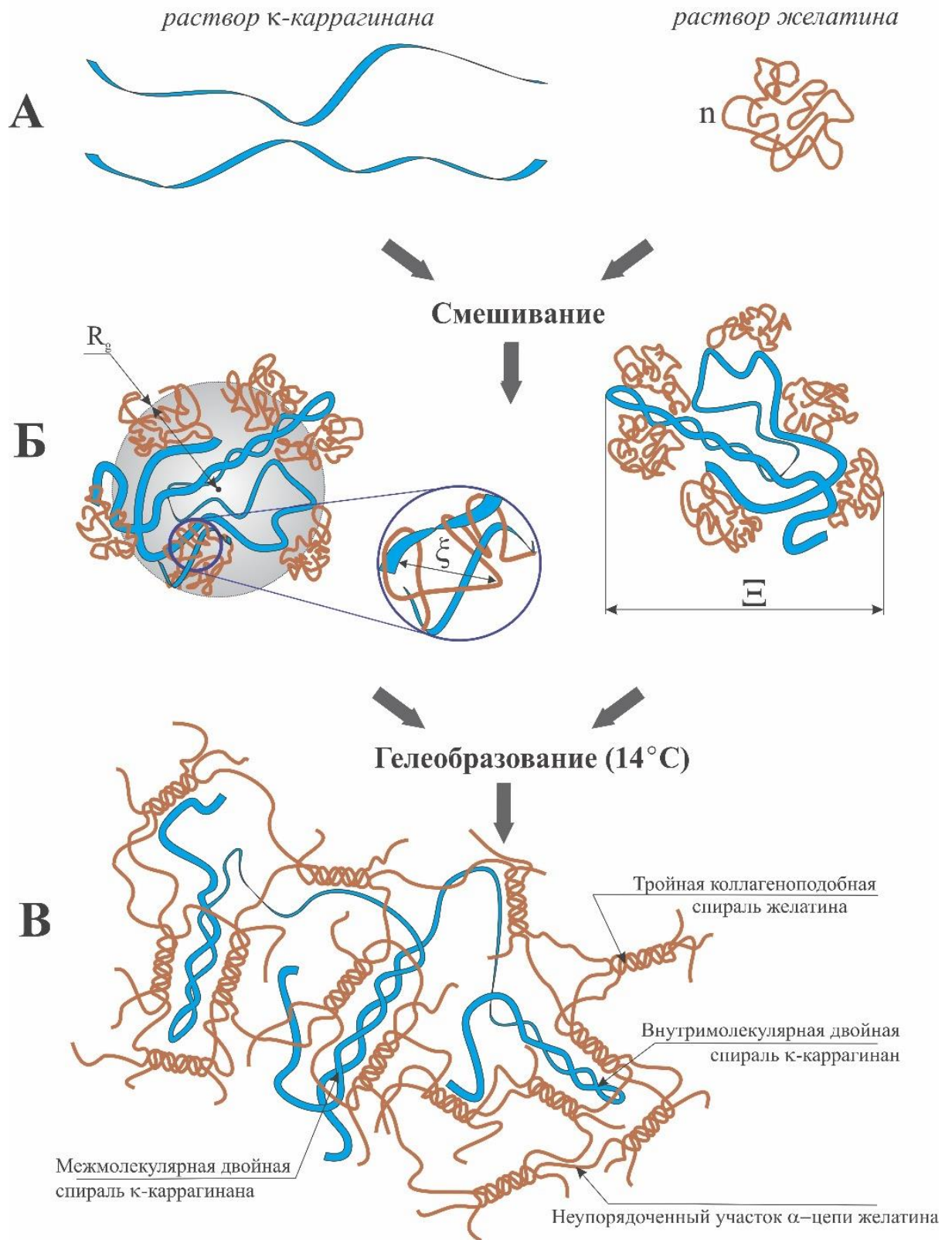


Рисунок 3.11 – (А) Качественная схема начальных конформаций κ-каррагинана и желатина; (Б) характерные размеры комплексов κ-каррагинана и желатина; (В) схема образования белок-полисахаридного гидрогеля.

Анализ структуры исходной и модифицированной углеродными нанотрубками системы в рамках гелевой модели Гаусса-Лоренца показал хорошее согласие между экспериментальными и расчетными кривыми малоуглового рассеяния (рис. 3.12). В рамках модели геля Гаусс-Лоренца параметры  $\Xi$  и  $\xi$  в диапазоне исследованных температур для образцов на основе индивидуальной желатины и  $\kappa$ -каррагинана изменяются в рамках экспериментальных погрешностей (табл. 3.2, рис. 3.12А,Б).

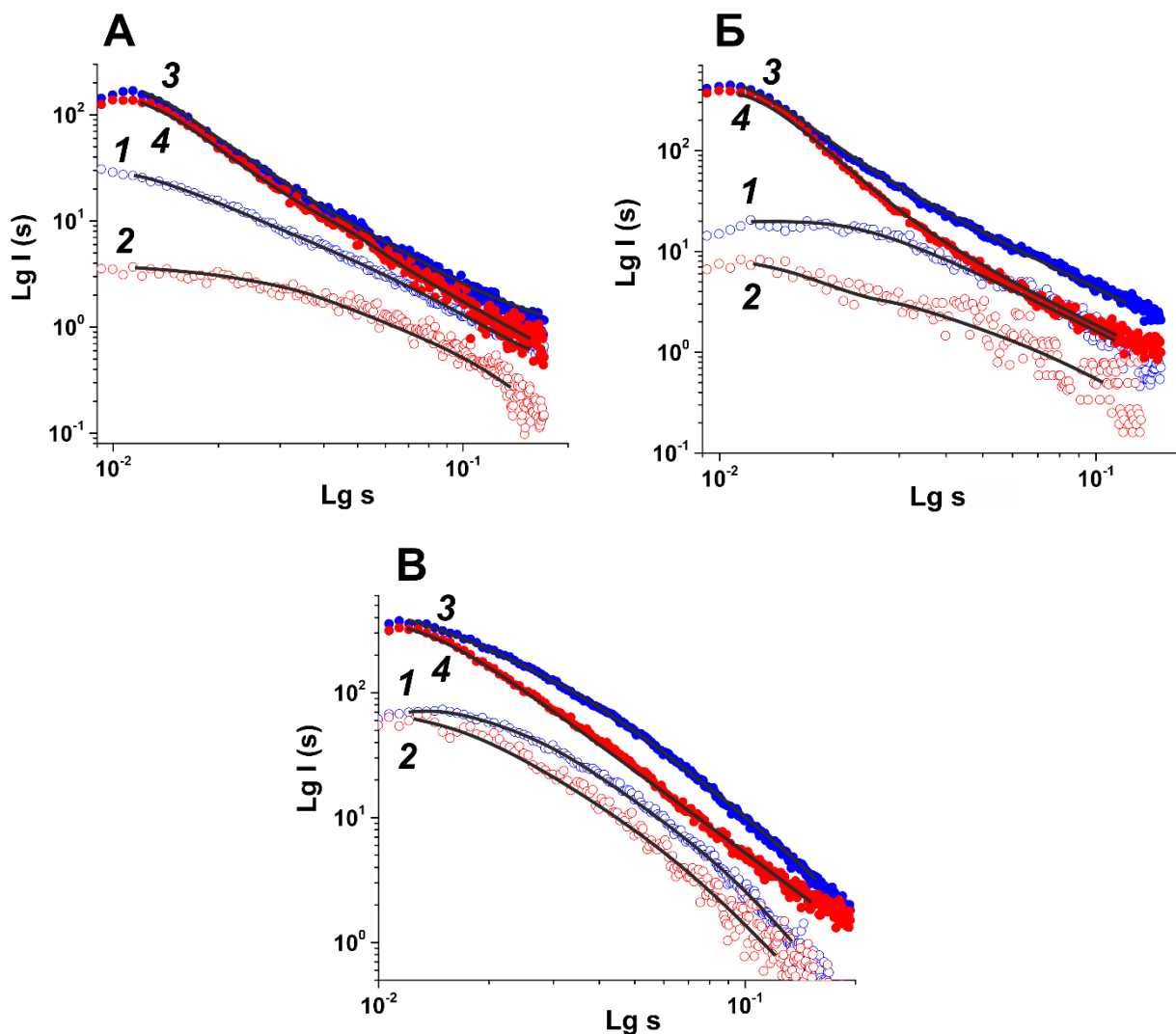


Рисунок 3.12 – Интенсивность МУРР образцов в двойном логарифмическом масштабе (точки и окружности разного цвета): (А) желатин: 1 – 14°C, 2 – 35°C; желатин-УНТ: 3 – 14°C; 4 – 35°C; (Б)  $\kappa$ -каррагинан: 1 – 14°C, 2 – 35°C;  $\kappa$ -каррагинан-УНТ: 3 – 14°C, 4 – 35°C; (В) Z=0.8: 1 – 14°C, 2 – 35°C; Z=0.8-УНТ: 3 – 14°C, 4 – 35°C. Сплошными линиями показаны теоретически рассчитанные кривые интенсивности малоуглового рассеяния в рамках модели Гаусс-Лоренц геля.



Полученные параметры для к-каррагинана  $\Xi \sim 50-60 \text{ \AA}$  и  $\xi \sim 24-28 \text{ \AA}$  коррелируют с полученными результатами авторов (Evmenenko *et al.*, 2001). Добавление УНТ привело к увеличению структурных параметров. Для комбинированных систем  $Z=0.8$  и  $Z=0.8$ -УНТ размер областей неоднородности геля увеличился с повышением температуры, со значения  $64.3 \text{ \AA}$  до  $100 \text{ \AA}$  ( $Z=0.8$ ) и с  $86.8 \text{ \AA}$  до  $122 \text{ \AA}$  ( $Z=0.8$ -УНТ) для  $14 \text{ }^\circ\text{C}$  и  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  соответственно (рис. 3.12В). Мы предполагаем, что эта особенность описывает структуру набухшей гелевой сетки.

При моделировании экспериментальных кривых используется вся кривая, а не только участок Гинье, поэтому нам удалось рассчитать структурные параметры  $R_c$  и  $L$  для желатины (рис. 3.13А) в рамках модели цилиндрических частиц геля. Полученные параметры к-каррагинана в той же модели равны  $R_c = 17 \text{ \AA}$ ,  $L = 160 \text{ \AA}$  ( $14 \text{ }^\circ\text{C}$ ) и  $R_c = 14.6 \text{ \AA}$ ,  $L = 215.9 \text{ \AA}$  ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ) и достаточно хорошо коррелируют с ранее полученными значениями  $R_c = 17 \text{ \AA}$ ,  $L = 160 \text{ \AA}$  ( $14 \text{ }^\circ\text{C}$ ) и  $R_c = 14.6 \text{ \AA}$ ,  $L = 215.9 \text{ \AA}$  ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ), рассчитанным по области Гинье (рис. 3.13Б).

Из представленных рисунков становится очевидным, что в рамках модели цилиндрических частиц геля не удастся добиться адекватного описания модельными кривыми наборов экспериментальных данных и это особенно заметно в случае анализа модифицированных УНТ систем и образцов комбинированных гелей (рис. 3.13). Очевидно, что выбранная в данном пакете цилиндрическая модель не адекватна полученным экспериментальным данным и не может быть использована для их анализа.

Мы полагаем, что целесообразно использовать в качестве корректно описывающей экспериментальные данные исследованных гелевых систем только модель геля Гаусса-Лоренца, имеющей ясный физический смысл в макромолекулярных системах с сеткой физических зацеплений и взаимодействий.

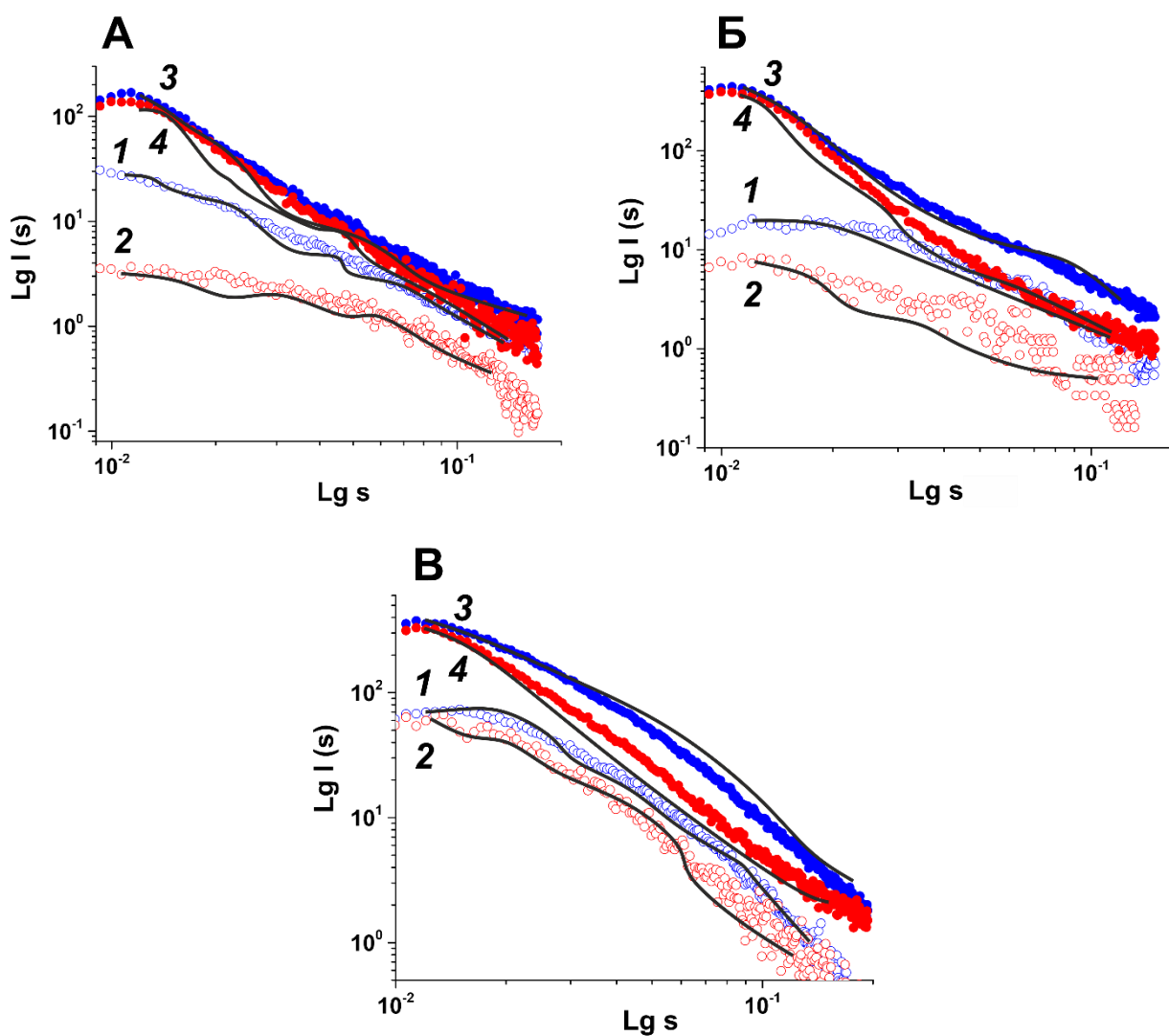


Рисунок 3.13 – Интенсивность МУРР образцов в двойном логарифмическом масштабе (точки и окружности разного цвета): (А) желатин: 1 – 14°C, 2 – 35°C; желатин-УНТ: 3 – 14°C; 4 – 35°C; (Б) κ-каррагинан: 1 – 14°C, 2 – 35°C; κ-каррагинан-УНТ: 3 – 14°C, 4 – 35°C; (В) Z=0.8: 1 – 14°C, 2 – 35°C; Z=0.8-УНТ: 3 – 14°C, 4 – 35°C. Сплошными линиями показаны теоретически рассчитанные кривые интенсивности рассеяния в рамках модели цилиндрических частиц геля.

Добавление в систему наноматериала УНТ давало ярко выраженный эффект. Увеличение размеров структурных элементов системы по всей видимости связано с адсорбцией ПЭК κ-каррагинан-желатин на поверхности УНТ, выполняющей функции каркаса для формирования в них надмолекулярной структуры (рис. 3.14).

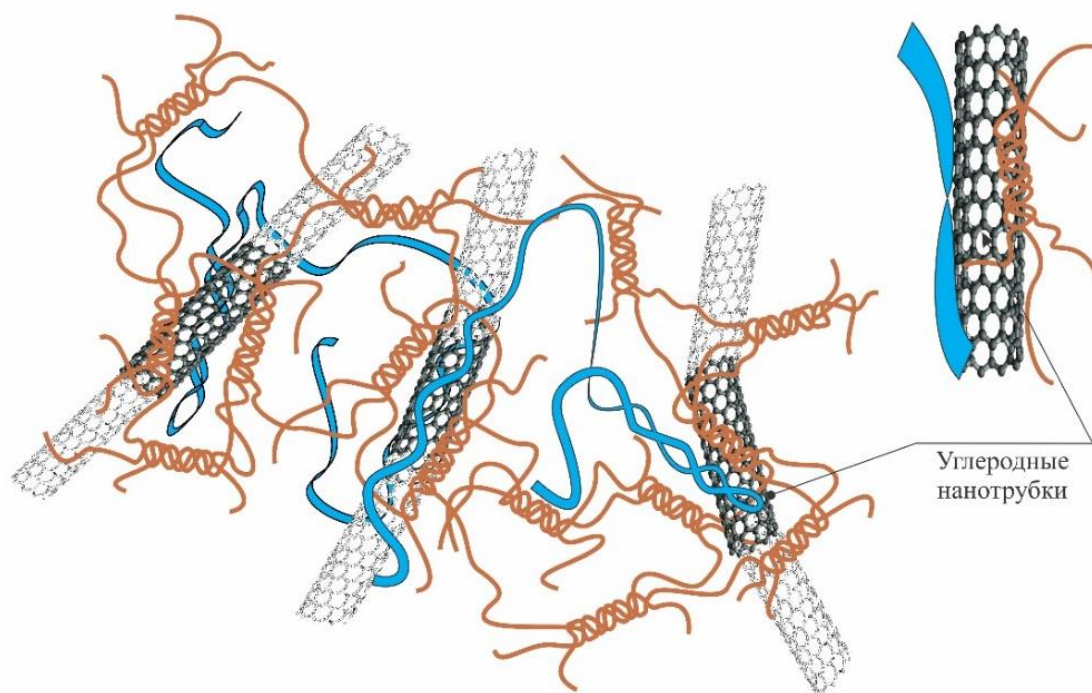


Рисунок 3.14 – Взаимодействия ПЭК к-каррагинан-желатин с поверхностью УНТ.

На рисунке показаны короткие фрагменты УНТ.

Анализируя влияние УНТ на пространственную организацию гидрогеля к-каррагинан-желатин, необходимо учитывать размер и пространственную концентрацию УНТ. Согласно информации производителя, используемые УНТ имеют средний внешний диаметр 20-50 нм и длину не более 2000 нм. Объемная доля УНТ не превышает 0.2-0.3 объемных процента. Таким образом, в присутствии УНТ мы имеем достаточно рыхлую углеродную сеть, а увеличение структурных размеров гидрогеля вероятнее всего возникает за счет встраивания УНТ в супрамолекулярную структуру геля (рис. 3.14). Примечательно, что по данным МУРР присутствие УНТ не нарушает существующую структуру гидрогеля на разных размерных уровнях.

Таким образом в работе показано, что переход из состояния золя (35°C) в состояние геля (14°C) не приводит к кардинальному изменению морфологии образца. Углеродные нанотрубки, присутствующие в системе, выступают в качестве дополнительного каркаса для формирования трехмерной сети. Анализ структуры гидрогелей в исходном и модифицированном присутствием УНТ в

рамках модели геля Гаусса-Лоренца показывает хорошее соответствие экспериментальных и расчетных данных МУРР. Установлено, что в пределах одной и той же температуры изменение размеров сшивок (динамической корреляционной длины) незначительно при модификации систем углеродными нанотрубками. При этом заметно увеличивается длина статистической корреляции (средний размер ПЭК), что свидетельствует об увеличении размеров молекулярных клубков в модифицированном геле.

### 3.3 Исследование морфологии гидрогелей с помощью сканирующей электронной микроскопии

Морфология гидрогелей была охарактеризована с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Микроструктура желатина состоит из коллагеноподобной фибриллярной структуры (рис. 3.15А) (Al Mahmud *et al.*, 2020), а к-каррагинана имеет волокнистую сеть (рис. 3.15Б) (Ермак и др., 2014).

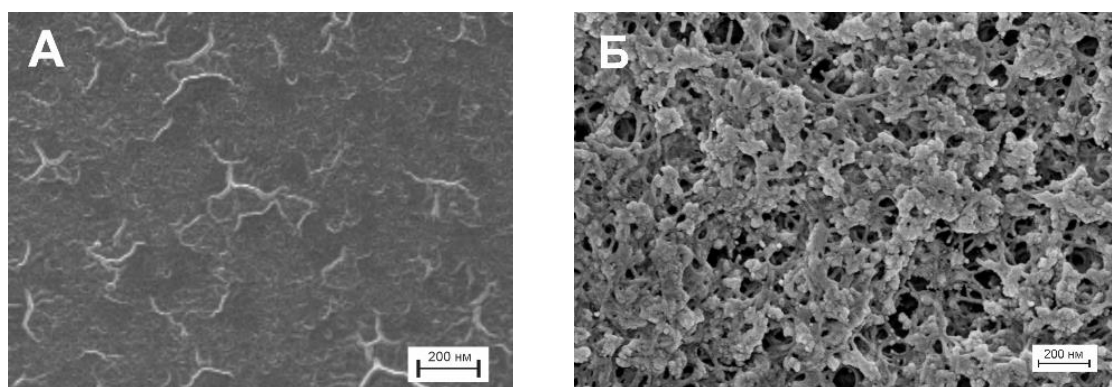


Рисунок 3.15 – СЭМ-изображения микроструктуры «чистого» (нативного) геля (А) желатина и (Б) к-каррагинана.

Объединение белка и полисахарида вызывает разительные изменения структуры (рис. 3.16А). Наблюдалось широкое распределение пор по размеру от мезо- до макропор. Исследована морфология белок-полисахаридных гидрогелей и их трансформация, связанная с добавлением УНТ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что УНТ хорошо диспергированы по всему объему образца,

без каких-либо признаков агрегации. Кроме того, в присутствии УНТ можно увидеть более регулярную полимерную сетку с несколько более тонкими волокнами (рис. 3.16Б) по сравнению с «чистым» гидрогелем к-каррагинан-желатин (рис. 3.16А).

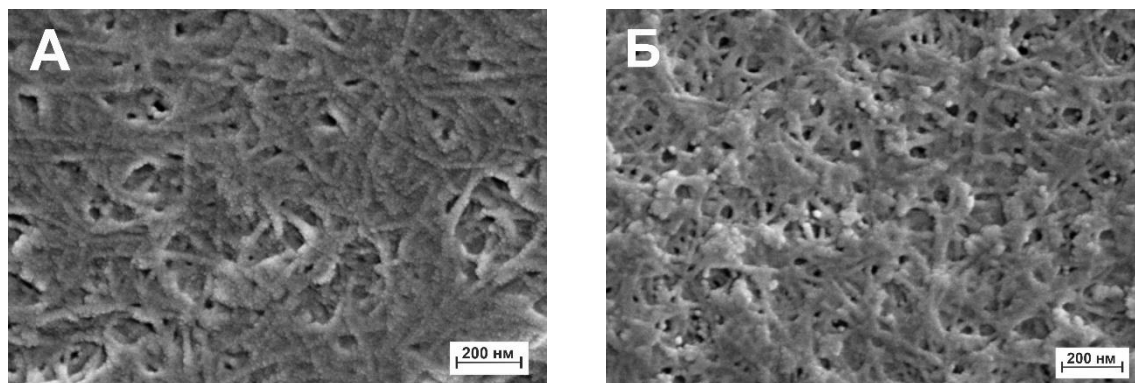


Рисунок 3.16 – СЭМ-изображения образцов композиционного гидрогеля на основе (А) к-каррагинан-желатина и (Б) к-каррагинан-желатина-УНТ.

### 3.4 Изучение макромолекулярной структуры гидрогелей методом атомно-силовой микроскопии

Эксперименты с АСМ (Liu *et al.*, 2011) обеспечили прямую структурную визуализацию белок-полисахаридных комплексов на наноразмерном масштабе и проиллюстрировали поведение исследуемой системы в присутствии УНТ. Для количественной оценки поверхности использовали параметра среднеквадратичной шероховатости ( $R_q$ ), который эквивалентен стандартному отклонению высот пиков (Workman *et al.*, 2003). Поверхность ксерогелей на основе ПЭК к-каррагинан-желатин отличается от структуры исходных компонент (рис. 3.17). Добавление к-каррагинана к желатину приводит к изменению надмолекулярной структуры (рис. 3.17А,В), которая представлена неоднородной шероховатой поверхностью, состоящей из плотно упакованных сферических частиц.

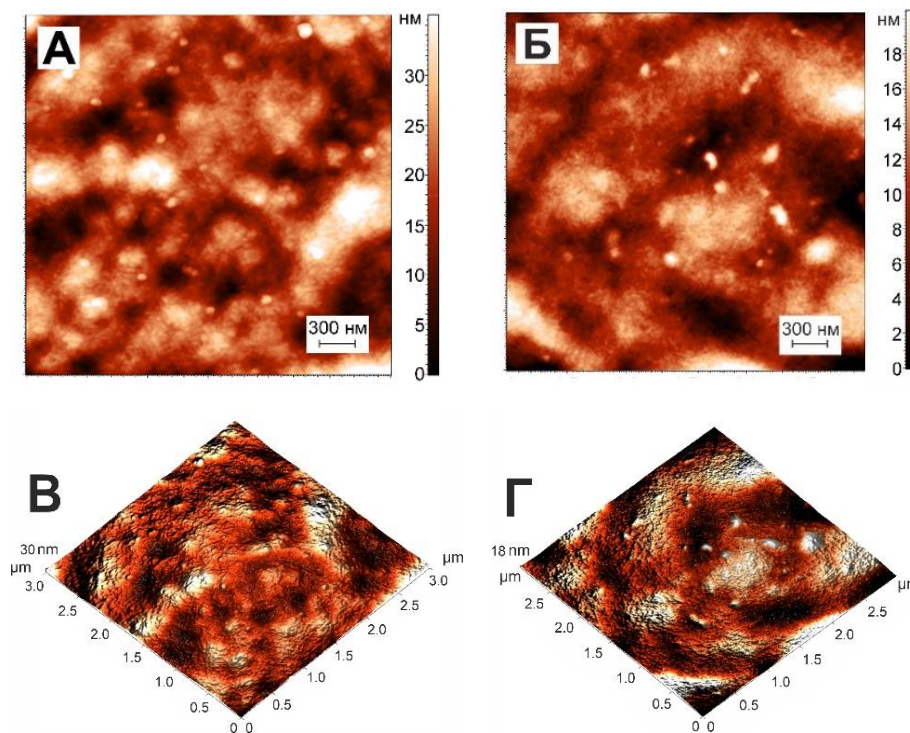


Рисунок 3.17 – АСМ-изображения ксерогелей на основе: (А) к-каррагинан-желатина; (Б) к-каррагинан-желатина-УНТ и трехмерные изображения: (В) к-каррагинан-желатина; (Г) к-каррагинан-желатина-УНТ.

Добавление УНТ к к-каррагинан-желатину (рис. 3.17Б,Г) приводит к снижению значения шероховатости поверхности  $R_q = 4.13$  нм по сравнению с «чистыми» ксерогелями к-каррагинан-желатина  $R_q = 6.98$  нм, что согласуется с результатами авторов (Roy *et al.*, 2021). Снижение значения шероховатости при добавлении УНТ может косвенно свидетельствовать о стабилизации надмакромолекулярной структуры ксерогеля и достаточно равномерном распределении УНТ в к-каррагинан-желатиновой матрице. Этот вывод качественно подтверждает результаты фрактального анализа, полученные на основе данных МУРР.

### 3.5 Физико-химические и механические свойства модифицированных к-каррагинан-желатиновых гидрогелей

#### 3.5.1 Реологические свойства гидрогелей, модифицированных углеродными нанотрубками

Для прогнозирования механических свойств сконструированных к-каррагинан-желатиновых гидрогелей, модифицированных углеродными нанотрубками, был применен реологический метод. Под системой в состоянии гидрогеля понимается система, в которой существует внутренняя пространственная структура, обладающая определенной структурной упорядоченностью и прочностью. Разрушение внутренней структуры гидрогеля при некотором критическом напряжении сдвига, называемом пределом текучести, приводит к возникновению течения с некоторой вязкостью, как правило, зависящей от приложенного напряжения сдвига. В состоянии покоя (или при напряжениях меньших предела текучести) гидрогель обладает свойствами твердообразного тела. Гидрогели могут проявлять способность к значительным обратимым деформациям.

Для определения области линейной вязкоупругости были получены амплитудные зависимости модуля упругости  $G'$  и модуля потерь  $G''$  при постоянной угловой частоте деформации  $\omega = 6.28 \text{ с}^{-1}$  для гидрогелей на основе желатина и к-каррагинан-желатина при  $14^\circ\text{C}$  (рис. 3.18).

Из рисунка 3.18 следует, что при малых амплитудах модуль упругости  $G'$  принимает постоянное значение, что свидетельствует о линейности механического поведения (Derkach, *et al.*, 2015), то есть они являются средами, проявляющими твердообразные свойства. Причем гелем является как система полиэлектrolитных комплексов, так и чистый желатина без добавок полисахарида.

Полученные результаты показывают достаточно протяженную область постоянных значений компонентов комплексного модуля упругости при увеличении амплитуды деформации. Данные, представленные на рисунке 3.18 позволяют оценить амплитуду деформации,  $\gamma^*$ , (и напряжение,  $\tau^*$ , как

произведение значения модуля упругости на соответствующую деформацию), отвечающую границе линейности. При амплитудах, превышающих некоторое критическое значение  $\gamma^*$  наблюдается резкое падение модуля упругости  $G'$  и возрастание модуля потерь  $G''$ , что позволяет говорить о переходе гидрогеля из твердообразного состояния в текучее (Pan *et al.*, 2019).

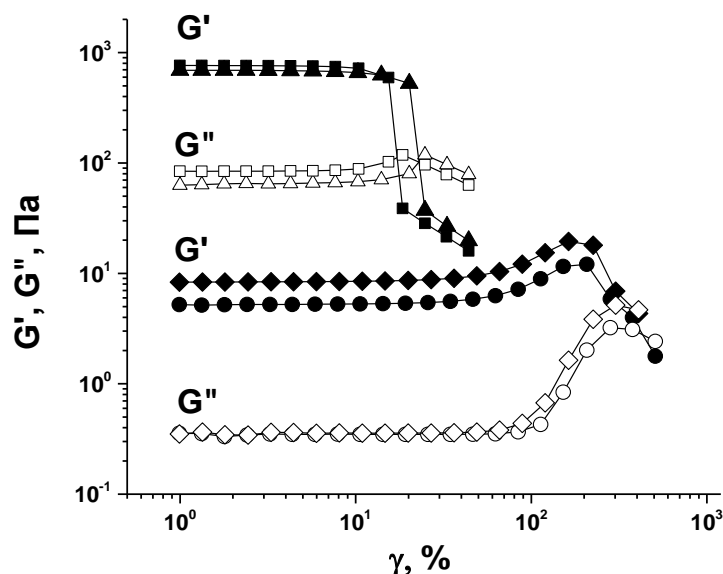


Рисунок 3.18 – Амплитудные зависимости модуля упругости  $G'$  (маркеры с заливкой) и модуля потерь  $G''$  (маркеры без заливки) гидрогелей на основе желатина ( $\bullet$ ,  $\circ$ ), желатина-УНТ ( $\blacklozenge$ ,  $\diamond$ )  $Z=0.8$  ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ) и  $Z=0.8$ -УНТ ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ) при  $T=14^\circ\text{C}$ ,  $\omega=6.28\text{ c}^{-1}$ .

Желатиновый гидрогель сохраняет линейность механических свойств вплоть до амплитуды деформации  $\gamma^* \approx 370\%$ , а при добавлении УНТ  $\gamma^* \approx 300\%$ , демонстрируя немного более слабую с точки зрения механики структурную сетку по сравнению с гидрогелем без УНТ. У к-каррагинан-желатинового ( $Z=0.8$ ) геля без УНТ переход в текучее состояние наблюдается при  $\gamma^* \approx 20\%$ , а с добавками УНТ при  $\gamma^* \approx 18\%$ .

Введение в желатин к-каррагинана хоть и приводит к возрастанию модуля упругости  $G'$  и модуля потерь  $G''$ , но и приводит к снижению предела области линейной вязкоупругости. Важно отметить, что для гелей к-каррагинан-желатин характерно изменение реологических свойств при массовом соотношении



полисахарид/белок превышающем  $Z=0.1$ , что свидетельствует об изменении структурной сетки геля (Derkach, *et al.*, 2018). А снижение значения деформации  $\gamma^*$  при переходе к текучему состоянию для модифицированных гелей, может свидетельствовать о более хрупкой сетке гидрогеля в присутствии УНТ.

На рис. 3.19 приведены амплитудные зависимости компонентов комплексного модуля упругости гидрогеля для состояния геля (14 °C) и золя (35 °C) в отсутствии и в присутствии УНТ. Интересно отметить, что для состояния золя в присутствии УНТ, модуль упругости превышает модуль потерь  $G' > G''$ , что указывает на армирующий эффект УНТ даже в системе, находящейся в жидком состоянии (рис. 3.20Б).

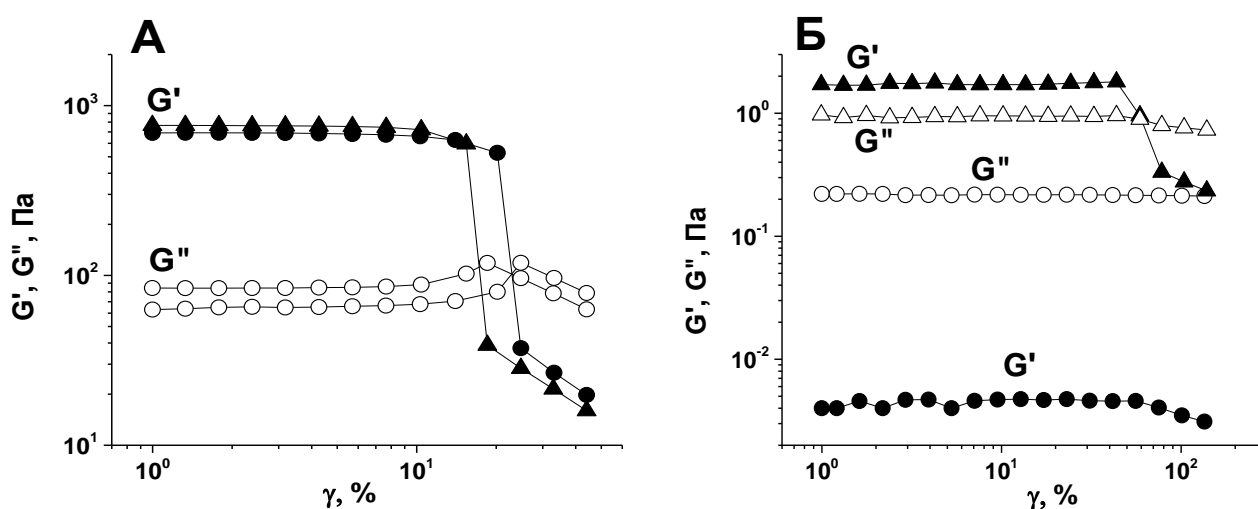


Рисунок 3.19 – Сравнение температур (А) 14 °C и (Б) 35°C для амплитудных зависимостей модуля упругости  $G'$  (маркеры с заливкой) и модуля потерь  $G''$  (маркеры без заливки) гидрогеля  $Z=0.8$  ( $\bullet$ ,  $\circ$ ) и  $Z=0.8$ -УНТ ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ), при  $\omega=6.28$  с $^{-1}$ .

Результаты измерений частотных зависимостей компонент динамического модуля для исследованных систем представлены на рис. 3.20. Слабая зависимость модулей упругости  $G'$  и потерь  $G''$  от частоты была обнаружена для всех исследуемых систем, при этом во всем частотном диапазоне модуль накопления превышает модуль потерь  $G' > G''$ , что свидетельствует о твердообразных свойствах исследуемых гидрогелей.

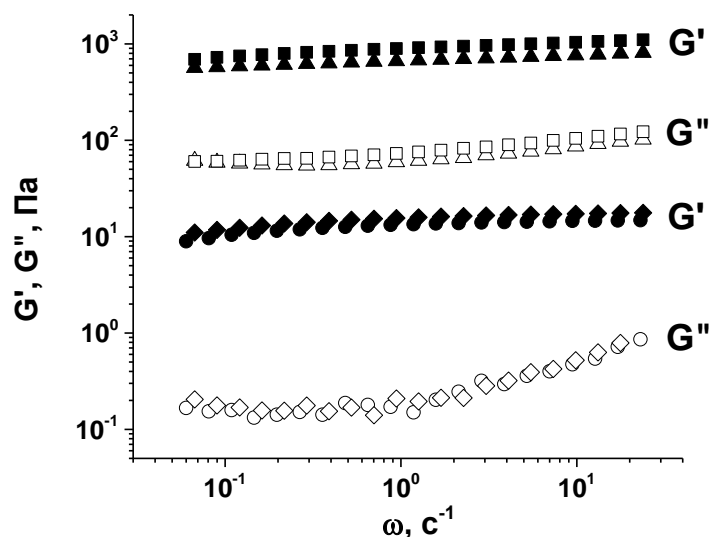


Рисунок 3.20 – Частотные зависимости модуля упругости  $G'$  (маркеры с заливкой) и модуля потерь  $G''$  (маркеры без заливки) гидрогелей на основе желатина ( $\bullet$ ,  $\circ$ ), желатина-УНТ ( $\blacklozenge$ ,  $\diamond$ )  $Z=0.8$  ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ) и  $Z=0.8$ -УНТ ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ) при  $T=14^\circ\text{C}$ ,  $\gamma = 1\%$ .

Установлено, что добавление УНТ во все исследуемые системы приводит к увеличению значения модуля упругости  $G'$  более чем на 15% (рис. 3.20). Увеличение модуля упругости может свидетельствовать об изменении структурной сетки гидрогеля при внесении УНТ, что может выражаться в увеличении числа узлов связывания или усилении упругой составляющей.

Ранее авторами (Derkach, *et al.*, 2018) было показано, что при высоких массовых соотношения к-каррагинан/желатина соотношениях ( $Z>0.1$ ) прочность геля и температура плавления резко возрастают при увеличении содержания полисахарида. Это связано с образованием дополнительных узлов связывания в пространственной сетке геля, состоящих из стопок тройных коллагеноподобных спиралей желатина, взаимодействующих с двойными спиральями к-каррагинана, что и является причиной избыточного упрочнения смешанного геля. По-видимому, модификация такого геля в присутствии УНТ приводит к дополнительной перестройке трехмерной структуры геля, приводящей к увеличению его упругих свойств.

На рисунке 3.21 представлены зависимости комплексной вязкости гидрогелей от угловой частоты при температуре 14°C. Полученные зависимости подтверждают, гидрогели и чистого желатина, и к-каррагинан-желатина обладают твердообразными свойствами. Кривые вязкости (в двойных логарифмических координатах) представляют собой прямые линии, тангенс угла наклона которых  $\text{tg } \alpha = -1$ . Все исследуемые системы проявляют неньютоновское поведение при изменении скорости сдвигового течения.

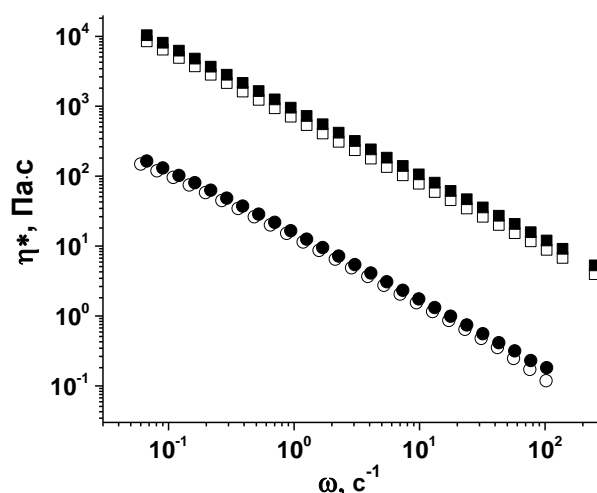


Рисунок 3.21 - Частотная зависимость комплексной вязкости ( $\eta^*$ ) гидрогеля на основе: желатина (○), желатина-УНТ (●), Z=0.8 (□) и Z=0.8-УНТ (■) при T=14°C,  $\gamma=1\%$ .

Значение комплексной вязкости гидрогелей на основе желатина находится на порядок ниже, чем гидрогелей к-каррагинан-желатин. Добавление УНТ в желатин увеличивает комплексную вязкость на  $\approx 10\%$ , а в системе к-каррагинан-желатина на  $\approx 20\%$ . Согласно данным (Dobrynin *et al.*, 2012), увеличение значения комплексной вязкости указывает на увеличение массы системы и запутыванию молекулярных цепей, следовательно, на увеличение энергии для изменения конформационных перестроек внутри системы (Ali *et al.*, 2021).

Таким образом, показано увеличение упругих и прочностных характеристик гидрогелей желатина и к-каррагинан-желатин вследствие их модификации УНТ. Увеличение реологических параметров подтверждает изменение трехмерной структуры геля при встраивании в нее углеродных нанотрубок, видимо в результате

увеличения упругих свойств узлов соединений и, возможно, в увеличении количества самих узлов. Упрочняющий эффект наблюдается и в структурированных водных смесях желатина с к-каррагинаном при 35°C, что также коррелирует с выводами по данным МУРР о наличии супрамолекулярной структуры даже в жидкой состоянии системы (золе).

### **3.5.2 Исследование влияния углеродных нанотрубок на температуру гелеобразования и электропроводность гидрогелей**

Известно, что использование наночастиц, в частности УНТ, приводит к модификации процесса гелеобразования, что можно качественно наблюдать по изменению электропроводности белок-полисахаридных гидрогелей (Mac Donald *et al.*, 2008; Voge *et al.*, 2013; Lillehei *et al.*, 2009). Данные изменения можно проследить при исследовании удельной электрической проводимости, в частности проанализировав температурные и концентрационные зависимости удельной электрической проводимости белок-полисахаридных гидрогелей.

Формально удельная электропроводность  $\chi$  (С) электролита определяется количеством ионов (с концентрацией С), переносящих электричество, и их зарядовым числом  $z$ . Концентрация ионов определяется степенью диссоциации ионных групп и подвижностью макроионов  $u_i$  и противоионов  $u_c$  в электрическом поле (Зуева и др., 2016).

Поскольку макроионы белков и полисахаридов в силу своих размеров и преимущественного нахождения в составе сетки геля можно считать слабоподвижными и не дающими заметного вклада в перенос зарядов, величина электропроводности подобных систем практически определяется количеством и подвижностью свободных противоионов.

Определяют электрическую проводимость исследованных гидрогелей преимущественно противоионы полисахаридов. В случае к-каррагинана это в основном ионы калия. Однако ионы калия не являются полностью свободными, поскольку в той или иной степени участвуют в формировании структуры ПЭК,

причем в результате постоянно идущего процесса ассоциации – диссоциации часть времени они могут находиться в связанном состоянии с сульфатными группами к-каррагинана  $O_3SO^-$  и с кислотными группами, входящими в состав желатина. В задачи данной работы не входило исследование механизмов проводимости гидрогелей. Это очень сложные электрохимические системы, в которых не просто оценить количество свободных носителей заряда. Важно иметь в виду, что в зависимости от фазового состояния системы (гель или золь) вязкость среды и ее проницаемость для ионов могут существенно отличаться. Кроме того, от фазового состояния может существенно отличаться и степень диссоциации противоионов. Для нас важно определить критические температурные области перехода систем от жидкого к гелеобразному состоянию и общие тенденции электрической проводимости под влиянием УНТ.

Полученные данные по удельной электрической проводимости гидрогелей, приготовленных на основе желатина и к-каррагинана в различных концентрациях с добавлением УНТ и без них, приведены на рисунке 3.22.

Большинство полученных зависимостей (за исключением системы без к-каррагинана) однозначно носят нелинейный характер. Все зависимости можно разделить на два вида. Системы без к-каррагинана и с его минимальным количеством ( $Z=0.1$ ) не демонстрируют никаких особенностей за исключением роста электропроводности при понижении температуры. Очевидно, в этих системах при понижении температуры смещается химическое равновесие и наблюдается увеличение степени диссоциации противоионов.

По-другому ведут себя системы с бóльшим содержанием полисахарида. Электропроводность закономерно уменьшается с понижением температуры, причем это связано, очевидно, с гелеобразованием в системе. На зависимостях четко прослеживаются три области, относящиеся к состоянию золя в области более высоких температур, состоянию геля в области более низких температур, а также промежуточная переходная область перехода жидкой дисперсии в гель (золь-гель).

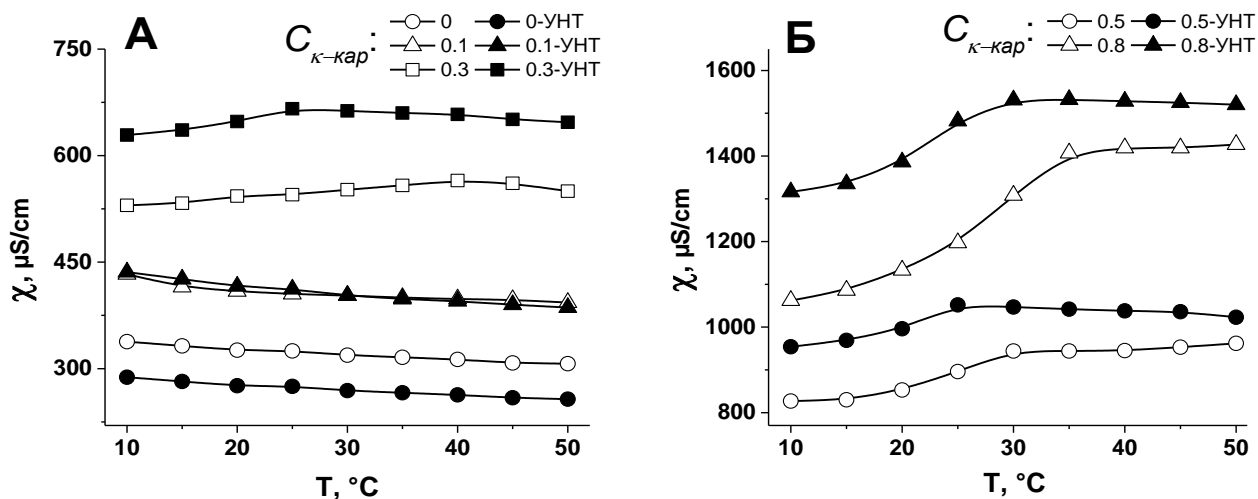


Рисунок 3.22 – Температурные зависимости удельной электрической проводимости гидрогелей, содержащих 1 мас. % желатина и различные концентрации (%)  $\kappa$ -каррагинана (пустые символы), указанные на рисунке.

Образцы с УНТ представлены закрашенными символами.

Следует обратить внимание, что перепад электропроводности при переходе из одного состояния в другое тем больше и резче, чем больше концентрация белок-полисахаридных ПЭК в системе, достигая своего максимума при  $Z=0.8$ , при котором практически все биополимеры участвуют в образовании ПЭК, что подтверждается данными турбодиметрического титрования. Очевидно, именно концентрация ПЭК определяет электропроводящие свойства гидрогелей, контролируемые структурной однородностью гетерогенной системой. Интересно отметить, что абсолютные значения электропроводности тем выше, чем больше в системе  $\kappa$ -каррагинана, что подтверждает высказанное предположение, что именно полисахарид является основным источником свободных ионов системе.

На рисунке 3.22 переходная сигмоидальная область по мере увеличения концентрации  $\kappa$ -каррагинана смещается в сторону более высоких температур. Состояния геля характеризуются меньшей электрической проводимостью, поскольку переносящие электрический заряд ионы в значительной степени связаны с сеткой гидрогеля и их средняя подвижность уменьшается. Для области жидкого состояния системы характерным является отсутствие роста электрической

проводимости растворов с температурой. Причиной этого – усиление гидрофобных взаимодействий с ростом температуры (Ben-Naim *et al.*, 2018; Хохлов и др., 1997), приводящее к появлению дополнительной упорядоченности в растворах.

Добавление УНТ не меняет сигмоидальную форму зависимостей, хотя несколько смещает гелеобразование в сторону низких температур. Кроме того, общий уровень электропроводности гидрогелей в присутствии УНТ существенно повышается, что сложно объяснить индуцируемыми ими структурными изменениями (напомним, что по данным МУРР не происходит кардинальных изменений структуры гидрогелей). Очевидно, свой вклад в общую электропроводность систем 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 гидрогелей. Показано, что проводимость связана со структурными перестройками в исследованных системах. Поэтому кондуктометрия наряду с другими методами может быть использована для детектирования структурных переходов в гидрогелях.

### **3.6 Влияние катионов металлов на структуру гидрогелей**

Гидрогели отличающегося состава, полученные различными методами, вызывают большой интерес разнообразием своих свойств, в частности по способности связывать и высвобождать различные биологически-активные вещества (БАВ) (Ma *et al.*, 2016).

Многие ионные полисахариды образуют физические гели в присутствии двухвалентных катионов. Например, в альгинате, состоящего из (1 → 4)-связанных  $\alpha$ -L-гулурановых и  $\beta$ -D-маннурановых остатков с различной последовательностью, двухвалентные катионы замещают одновалентный ион натрия и индуцируют ассоциацию цепей за счет поперечной физической сшивки блоков гулурановой кислоты соседних молекул альгината (рис. 3.23), известной как «модель яичной

упаковки» (Morris *et al.*, 1978).

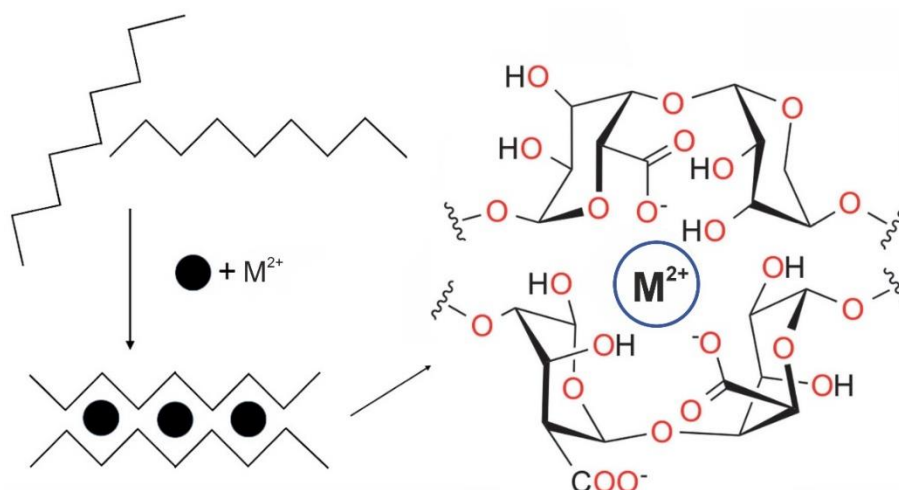


Рисунок 3.23 – Гелеобразование альгината по модели «яичной упаковки».

В настоящем параграфе приведены результаты исследования морфологии гидрогелей альгината в присутствии различных двухвалентных катионов. Различные двухвалентные катионы, добавленных к альгинату натрия, приводят к измененной внутренней структуре гидрогелей. Данный раздел работы был мотивирован возможностью модификации структуры гидрогелей для моделирования систем доставки биологически активных веществ, различающихся по удерживающей способности и пролонгации выхода зондов. При этом мы опирались на известные результаты о зависимости некоторых свойств альгинатных гелей, в частности, механической прочности от типа двухвалентными катионов, которая соответствует следующей последовательности  $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+}$  (Russo *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2019). В связи с используемой методикой приготовления гидрогелей были получены образцы в виде микросфер диаметром около 2 мм, которые можно использовать в качестве биосовместимых контейнеров.

Были приготовлены семь видов альгинатных микросфер, в которых с использованием солей  $Ba(NO_3)_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $SrCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $NiSO_4$  одновалентный ион  $Na^+$  заменялся на двухвалентные ионы  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,



$Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ . Фотографии лиофильно высушенных сфер представлены на рисунке 3.24.

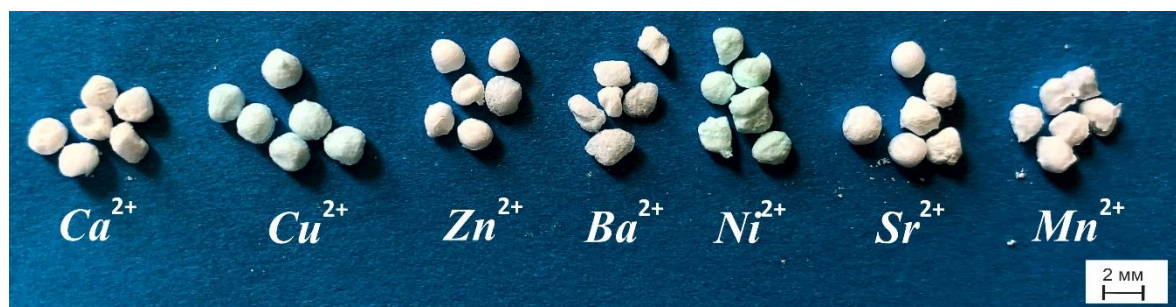


Рисунок 3.24 – Лиофилизированные сферы, полученных из гидрогеля альгината в присутствии двухвалентных катионов.

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. 3.25А-Ж).

Поры в системе на основе ионов  $Ba^{2+}$  имеют наименьший размер  $30\pm 10$  мкм в исследуемой линейке катионов. Поры имеют характерную ромбическую форму и достаточно однородное строение (рис. 3.25А). В присутствии ионов  $Sr^{2+}$  (рис. 3.25Б) поры неоднородны по своим размерам. Присутствие ионов  $Ca^{2+}$  приводило к образованию равномерной структуры с диаметром пор  $50\pm 20$  мкм (рис. 3.25В). Ионы  $Zn^{2+}$  (рис. 3.25Г) также провоцировали образование достаточно однородной пористой структуры с размером пор около  $50\pm 30$  мкм. В присутствии ионов  $Ni^{2+}$  пористая структура получалась крайне неоднородной, размер пор варьировал в диапазоне от 80 мкм до 200 мкм (рис. 3.25Е). Обращают на себя внимание ионы (рис. 3.25Д,Ж). Формирование структуры в присутствии данных катионов приводило к образованию двух структурных зон. Cu-альгинатная система имеет ячеистую структуру с четким радиальным порядком изменения размеров пор. Внутренняя часть лиофильно высушенных микросфер на основе  $Cu^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  почти полая. Очень необычен сам вид ячеек внутренней части Mn-альгинатных микросфер, с ажурной структурой стенок.

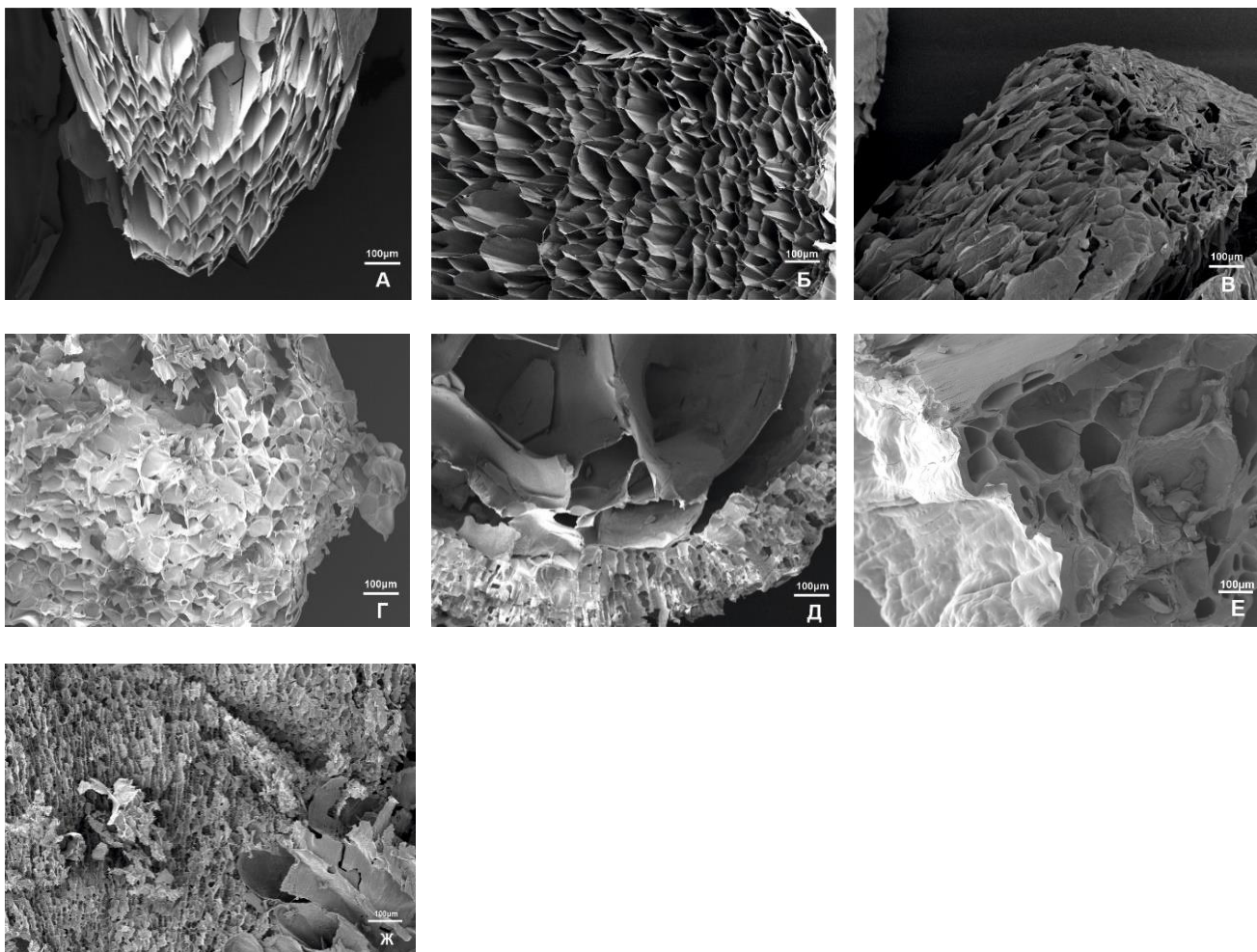


Рисунок 3.25 – СЭМ-изображения ячеек металл-альгинатных сфер: (А) Ba, (Б) Sr, (В) Ca, (Г) Zn, (Д) Cu, (Е) Ni, (Ж) Mn.

Обнаруженные различия микроструктуры капсул в присутствии различных двухвалентных катионов могут иметь высокую практическую значимость, поскольку, вероятно будут влиять на проницаемость этих систем для иммобилизованных соединений, на эффективности связывания БАВ и скорость их высвобождения.

Влияние УНТ на морфологию гидрогелевых микросфер было изучено с использованием альгината и κ-каррагинана. Следует напомнить, что для улучшения диспергирования УНТ был использован желатин (раздел 2.1.1). Поэтому влияние УНТ на морфологию и свойства белок-полисахаридных гелей изучалось на двух системах: альгинат-желатин и κ-каррагинан-желатин.

Было обнаружено, что в сравнении со сферами альгинат-желатин (рис. 3.26А,Б и рис. 3.27А), к-каррагинан-желатин имеют «неправильную» сферическую форму (рис. 3.27В,Г и рис. 3.28Б), также упоминаемую авторами (Hossain *et al.*, 2015) и существенное различие по размерам.

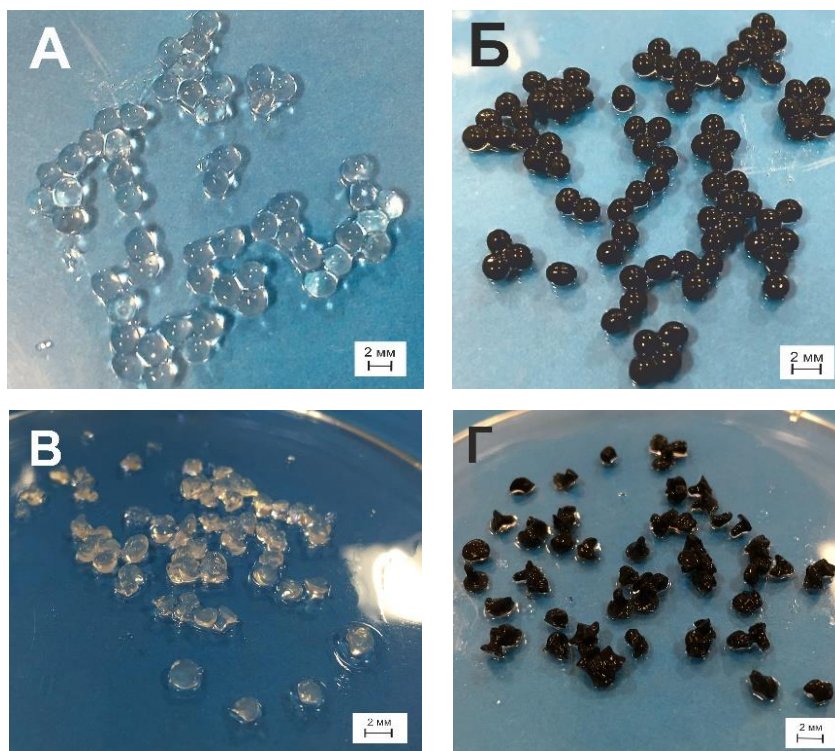


Рисунок 3.26– Сферы на основе: (А) альгинат-желатина; (Б) альгинат-желатина-УНТ; (В) к-каррагинана-желатина; (Г) к-каррагинана-желатина-УНТ.

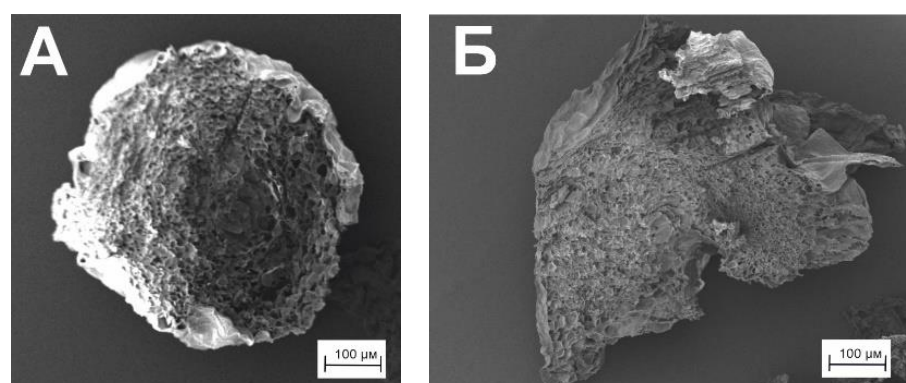


Рисунок 3.27 – СЭМ-изображения сфер на основе: (А) альгинат-желатина и (Б) к-каррагинан-желатина.

Для оценки морфологии сфер их лиофильно высушили, разрезали и срез изучали на СЭМ. Альгинат-желатиновые сферы и сферы при добавлении УНТ обладали ячеистой структурой с размером пор  $\sim 4-10$  мкм (рис. 3.28А,Б). Сформированные структуры на основе к-каррагинан-желатин и при добавлении УНТ также имели ячеистую структуру с размером пор  $\sim 4-8$  мкм (рис. 3.28В,Г).

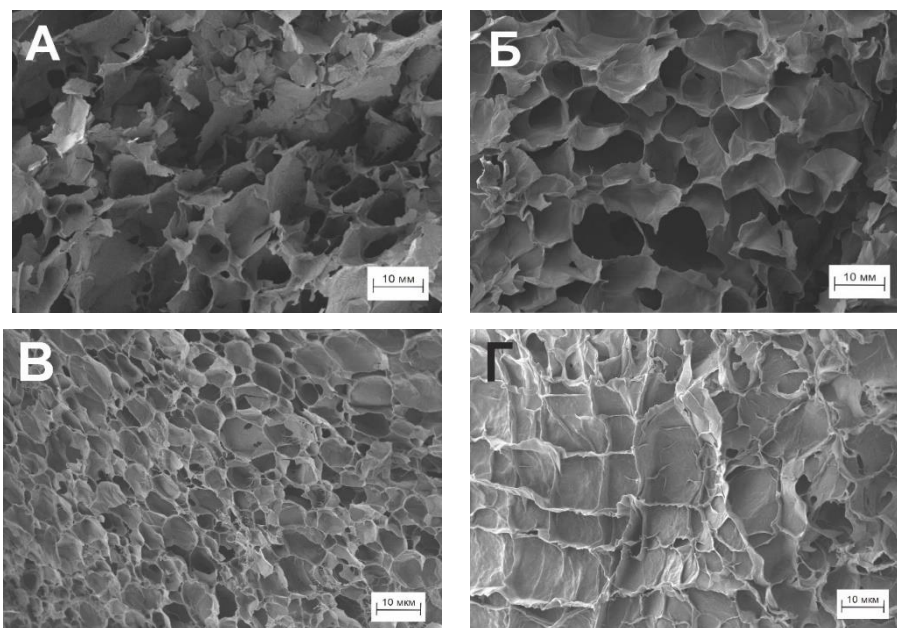


Рисунок 3.28 – СЭМ-изображения внутренней структуры сфер на основе: (А) альгинат-желатина; (Б) альгинат-желатина-УНТ; (В) к-каррагинан-желатина; (Г) к-каррагинан-желатина-УНТ.

### 3.7 Кинетика высвобождения биологически активных веществ из белок-полисахаридных гидрогелей

Белок-полисахаридные гидрогели вызывают большой интерес для исследования инкапсулирующей и удерживающей способности в отношении биологически активных веществ. При включении зонда в биополимерный гель важными параметрами, которые определяют возможность контролируемого высвобождения инкапсулируемого вещества из полимерной системы, являются молекулярная масса и заряд молекулы зонда (Barba *et al.*, 2012; Cascone *et al.*, 2012). Данные факторы играют решающую роль при диффузии инкапсулированных

соединений из гидрогеля в физиологическую среду. В случае использования зонда с суммарным положительным зарядом, вследствие взаимодействия с отрицательно заряженными группами анионных полисахаридов, возможно значительное замедление диффузии (Smidsrod *et al.*, 1990) по сравнению с зондами, обладающими суммарно нейтральным или отрицательным зарядом. Другим фактором, влияющим на скорость высвобождения зонда из гидрогеля, является размер пор. Размеры пор зависят от концентрации полисахарида и сшивающих агентов, pH, температуры раствора (Sugawara *et al.*, 1994). Использование модификаторов, например, УНТ, изменяющих размер и проницаемость пор (Vaig *et al.*, 2021) также может изменить скорость высвобождения инкапсулируемого вещества из гелей.

Нами были исследованы альгинат-желатиновые и κ-каррагинан-желатиновые гидрогели для оценки инкапсуляции и пролонгированного высвобождения биологически активных веществ (БАВ) – красителей, витаминов и ферментов. В качестве инкапсулируемых зондов использованы: водорастворимые витамины группы В (рибофлавин (В<sub>2</sub>) и фолиевая кислота (В<sub>9</sub>)); ферменты липаза *Candida rugose* и бактериальная РНКаза биназа *Bacillus pumilus*; красители: катионный бриллиантовый зеленый (БЗ), анионный метиловый оранжевый (МО) и нейтральный флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ).

Временной профиль высвобождения красителей (Y) (уравнение 2.11), включенных в белок-полисахаридные сферы, показан на рисунке 3.29.

Альгинат-желатиновые сферы слабо связывают анионный МО и нейтральный ФИТЦ, что видно по большому проценту освободившегося красителя уже в течении первого часа эксперимента (рис. 3.29А). Добавление УНТ практически не влияло на удерживающую способность систем, хотя можно констатировать небольшое ускорение выхода в их присутствии. В случае катионного БЗ (рис. 3.29Б) наблюдается эффективное удерживание красителя в альгинат-желатиновой матрице в течение длительного времени. Полученные результаты свидетельствуют, что добавление УНТ приводит к существенному увеличению связывания БЗ и уменьшению скорости его высвобождения.

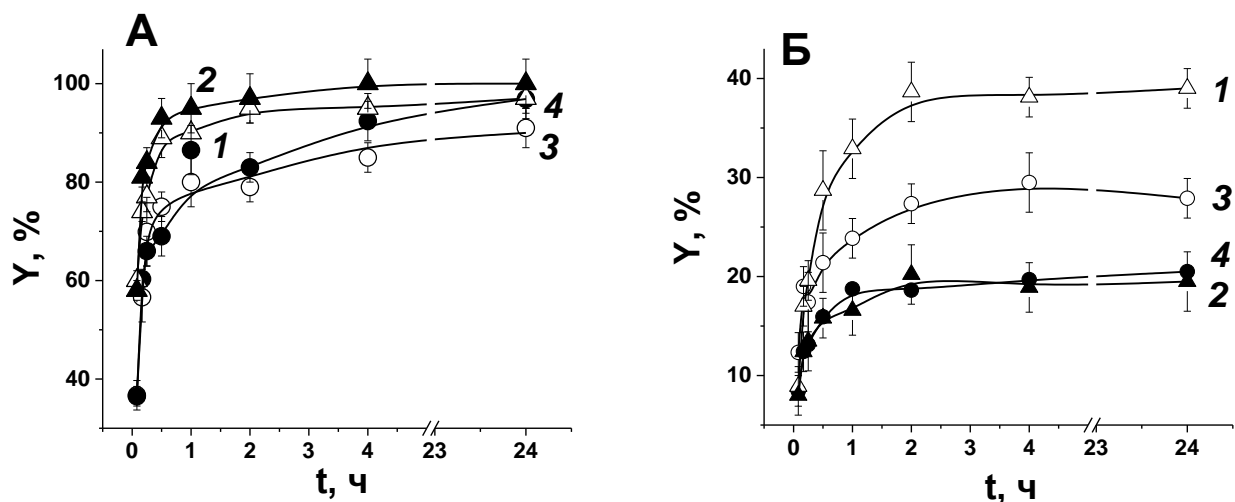


Рисунок 3.29 – Кинетика высвобождения красителей из альгинат-желатиновых сфер: (А) 1 – ФИТЦ; 2 – ФИТЦ-УНТ; 3 – МО; 4 – МО-УНТ; (Б) 1 – БЗ; 2 – БЗ-УНТ (2 мас. % альгината) и 3 – БЗ; 4 – БЗ-УНТ (0.7 мас. % альгината).

Для оценки влияния концентрации полисахарида на высвобождение красителя были приготовлены сферы из 0.7 мас. % альгинат-желатинового гидрогеля, который, как было показано (Богданова др., 2019), образует менее плотную матрицу с большим размером пор. Согласно полученным данным (рис. 3.29Б) уменьшение концентрации альгината обусловило более быстрый выход БЗ в раствор (38% через 4 ч), т.е. плотность полимерной сетки оказывает влияние на количество связываемого красителя и/или его диффузию. Добавление УНТ привело к повышению связывающей способности гидрогеля и уменьшению доли вышедшего красителя на 20%. Таким образом, было показано, что сконструированные системы эффективно удерживают положительно заряженный зонд (БЗ), очевидно за счет электростатического взаимодействия с анионными группами полисахаридов. Уменьшая концентрацию полисахарида, можно регулировать скорость высвобождения этого зонда.

На рисунке 3.30А показан временной профиль высвобождения рибофлавина (витамина В<sub>2</sub>) и фолиевой кислоты (витамина В<sub>9</sub>).

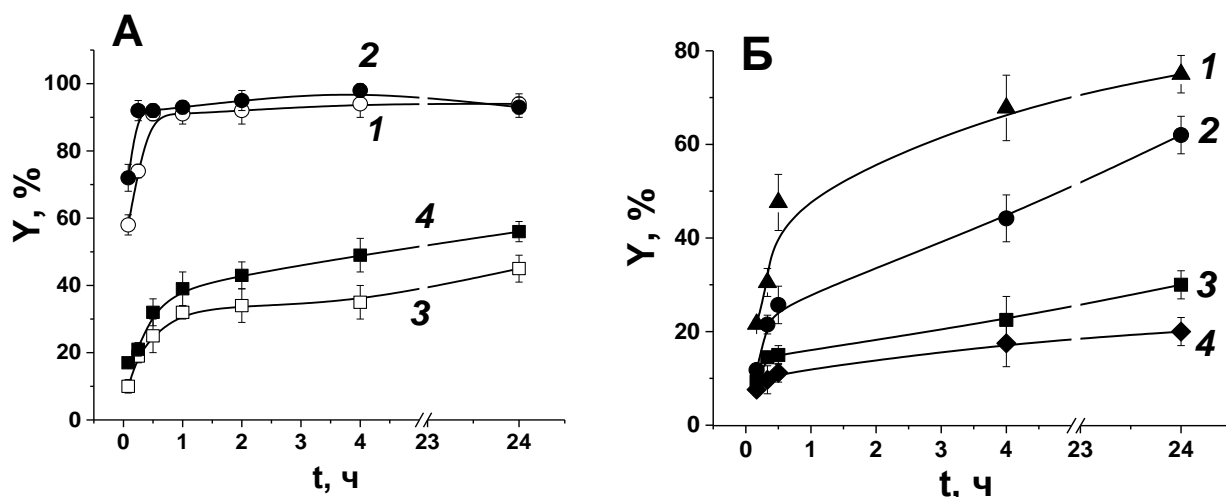


Рисунок 3.30 – Кинетика высвобождения витаминов из альгинат-желатиновых сфер: (А) 1 - В<sub>2</sub>; 2 – В<sub>2</sub>-УНТ; 3 – В<sub>9</sub>; 4 – В<sub>9</sub>-УНТ; (Б) выход В<sub>9</sub> в зависимости от рН: 1 – рН = 10.4; 2 – рН = 8.5; 3 – рН = 7.5; 4 – рН = 6.2.

В отличие от анионного рибофлавин (В<sub>2</sub>), фолат-анион (В<sub>9</sub>) эффективно удерживается в альгинатном гидрогеле. Вероятно, это связано с тем, что ионы Ca<sup>2+</sup> выступают в качестве сшивающего агента, и молекулы фолиевой кислоты прочно фиксируются в альгинатной матрице за счет связи -COO<sup>-</sup><sub>B9</sub>- Ca<sup>2+</sup>- COO<sup>-</sup><sub>альгинат</sub> (рис. 3.31).

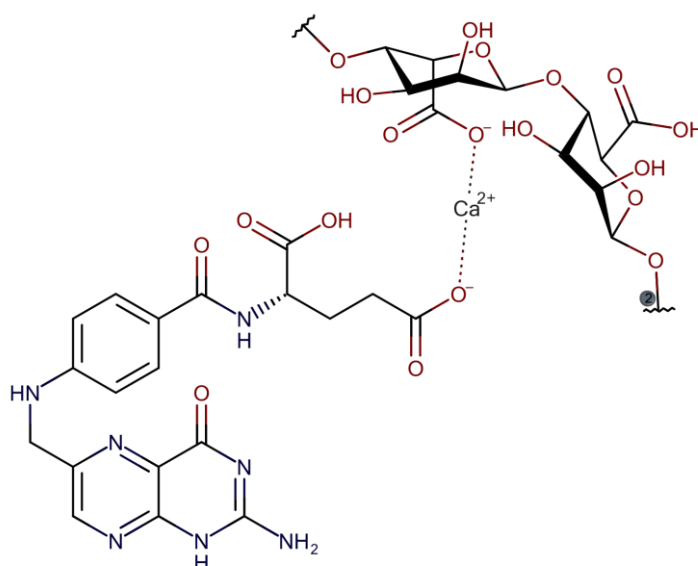


Рисунок 3.31 – Возможное образование сшивки между витамином В<sub>9</sub> и альгинатной матрицей.

Нами показано, что скорость высвобождения витамина В<sub>9</sub> можно регулировать изменением рН среды. На рис. 3.30Б показано, что вариация рН раствора приводит к изменению скорости выхода витамина В<sub>9</sub> из альгинатного гидрогеля. С повышением рН скорость выхода витамина В<sub>9</sub> возрастает. В слабокислой среде рН = 6.2 и в слабощелочной рН = 7.5 капсулы на основе Са-альгината не претерпели значительных изменений, а выход включенного В<sub>9</sub> обусловлен диффузионными процессами через пористую структуру альгината. В щелочной среде при рН = 8.5 и 10.4 скорость выхода В<sub>9</sub> будет ускоряться, с одной стороны, за счет биодеградации (эрозии) сфер, а с другой стороны, в этих условиях происходит щелочной гидролиз связи между фолиевой кислотой и Са<sup>2+</sup>, что также способствует более быстрому высвобождению витамина В<sub>9</sub>.

Из-за невозможности в случае гидрогеля к-каррагинан-желатина получить сферы правильной формы и существенного их различия по размерам, белок-полисахаридный гель формировался в форме гелеобразного цилиндра, а не сферы (при этом по сравнению со сферами уменьшается отношение площадь/объем).

Из к-каррагинан-желатинового геля витамин В<sub>9</sub> высвобождался быстрее по сравнению с системой альгинат-желатин (рис. 3.32А). Это связано с тем, что во втором случае в системе присутствуют катионы Са<sup>2+</sup>, способные дополнительно удерживать витамин В<sub>9</sub> внутри гидрогеля. Добавление УНТ ускоряет выход зонда из к-каррагинан-желатинового гидрогеля на 20%.

Катионный краситель БЗ практически не выходит из полисахаридных гидрогелей (рис. 3.32Б), так как в структуре полисахаридов высокая концентрация отрицательных зарядов (анионные карбоксильная и сульфатная группы), которые эффективно связывают этот зонд. Добавление УНТ не оказывает существенного влияния на инкапсулирующую способность сконструированных систем по отношению к БЗ.



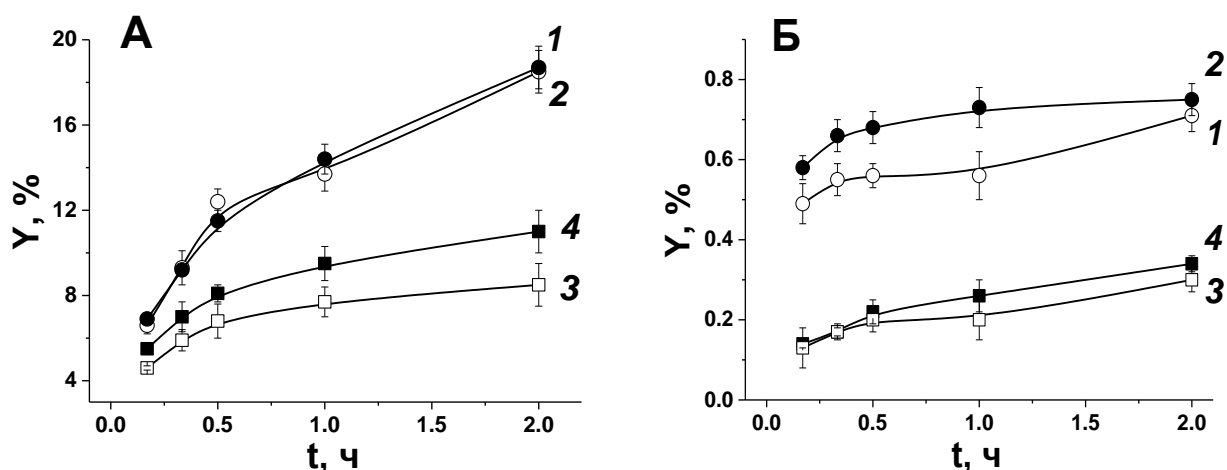


Рисунок 3.32 – Кинетика высвобождения (А) витамина В<sub>9</sub> и (Б) красителя БЗ из: 1 – κ-каррагинан-желатин; 2 – κ-каррагинан-желатин-УНТ; 3 – альгинат-желатин; 4 – альгинат-желатин-УНТ.

Пероральное введение белков (ферментов) терапевтического действия встречает ряд трудностей, связанных с потерей активности ферментов. В этом случае для направленной и контролируемой доставки лекарств могут использовать белок-полисахаридные гидрогели, предохраняющие препарат от деструктирующего действия физиологической среды (Ariga *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2013).

В этой работе в качестве инкапсулируемых зондов использовались ферменты биназа *Bacillus pumilus* и липаза *Candida rugosa* (рис. 3.33).

На основе первичной аминокислотной последовательности был оценен заряд ферментов (<https://www.protpi.ch>) при физиологическом значении pH (7.4), где биназа имеет невысокий положительный заряд (+3.3), а липаза сильно отрицательный (-18.9). Скорее всего высокий выход липазы связан с отсутствием электростатического связывания (задерживающего выход фермента) между липазой и отрицательно заряженными альгинатом и κ-каррагинаном, являющимися компонентами гидрогелевой матрицы (рис. 3.33Б). При добавлении УНТ скорость выхода липазы существенно замедляется, что связано скорее с дополнительным структурированием гидрогелей, и, возможно, возникновением

дополнительных стерических препятствий со стороны УНТ для крупных молекул липазы (ММ=57 кДа).

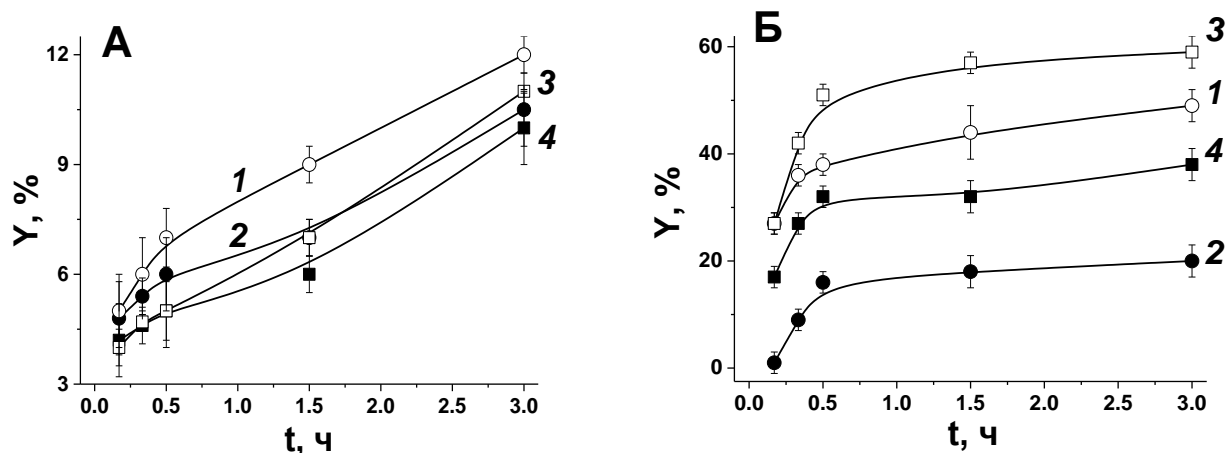


Рисунок 3.33 – Кинетика высвобождения (А) биназы *Bacillus pumilus* и (Б) липазы *Candida rugosa* из гидрогелей: 1 – κ-каррагинан-желатин; 2 – κ-каррагинан-желатин-УНТ; 3 – альгинат-желатин; 4 – альгинат-желатин-УНТ.

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.

### 3.8 Влияние полисахаридной матрицы на структуру ферментов

Информация о стабильности структуры белков при взаимодействии с другими макромолекулами важна для понимания процессов, происходящих в живых организмах. С другой стороны, ответ на этот вопрос полезен и при разработке различных биосовместимых комбинаций медико-биологического назначения, имеющих в своем составе белки. Для оценки возможных изменений в структуре ферментов при взаимодействии с полисахаридной матрицей

использовалась флуоресценция триптофана, которая чувствительна к полярности окружения этого остатка (Graupner *et al.*, 1999).

Триптофановые остатки служат внутренними спектральными зондами. Индольное кольцо триптофана – уникально чувствительный и сложный флуорофор. Специфические взаимодействия триптофана с локальным окружением влияют на его флуоресценцию, отражая полярность их ближайшего окружения (Лакович, 1986). В целом, применяя метод триптофановой флуоресценции, можно получить информацию о внутренней подвижности белковой молекулы, степени самоассоциации белка, а также о доступности триптофановых остатков растворителю (Graupner *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2016).

В данном разделе исследовалось взаимодействие альгинатного гидрогеля с двумя белками, нативная структура которых хорошо известна. Это бактериальная РНКаза (биназа *Bacillus pumilus*) и липаза *Candida rugosa*. Ферменты этих классов широко распространены в природе и участвует в важнейших биохимических процессах и активно используются в медицине.

Рибонуклеазы (РНКазы) представляют собой ферменты, гидролизующие РНК. Микробные РНКазы являются перспективным объектом для разработки новых противоопухолевых препаратов благодаря простоте получения, возможности разнообразных модификаций и отсутствию связывания с внутриклеточным ингибитором РНКаз RI. В данной работе была использована внеклеточная гуанил-специфическая РНКаза, называемая биназой, экстрагированная из грамположительной аэробной спорообразующей палочки *Bacillus pumilus* (Ульянова *et al.*, 2011). Липазы (триацилглицеролгидролазы) – хорошо изученный ранее в нашей лаборатории класс ферментов, чья активность регулируется физико-химическими свойствами среды (Bogdanova *et al.*, 2012). Кроме того, липазы активно используются в терапии нарушений пищеварения (ферментная недостаточность), специфических нарушений липидного обмена, таких как инсулинорезистентность, ожирение и метаболический синдром (Schicher *et al.*, 2010). Специфическое функциональное свойство липаз, которые работают в присутствии определенной поверхности раздела (например, липидный бислой),

рождает различные технологические приложения, использующие иммобилизацию ферментов, включая полисахаридную матрицу (Dong *et al.*, 2020).

Контакт фермента с альгинатным гидрогелем может изменить его структуру и каталитические свойства. Молекула биназы состоит из 109 аминокислот, включая 3 триптофана с номерами 43, 70, 93 (рис. 3.34А), а молекула липазы состоит из 534 аминокислотных остатков, включая 5 остатков триптофана с номерами 119, 161, 188, 221, 489 (рис. 3.34Б). Наличие в структуре ферментов нескольких остатков триптофана усложняет интерпретацию спектров их флуоресценции. Для анализа полученных спектров мы использовали модель дискретных состояний, согласно которой все остатки триптофана в белках делятся на пять классов со строго определенной длиной волны флуоресценции в зависимости от локального микроокружения триптофана в белке (Reshetnyak *et al.*, 2001). Используя алгоритм разложения триптофановых спектров флуоресценции белков (Burstein *et al.*, 2001) было установлено, что спектр липазы и биназы состоит из двух компонентов.

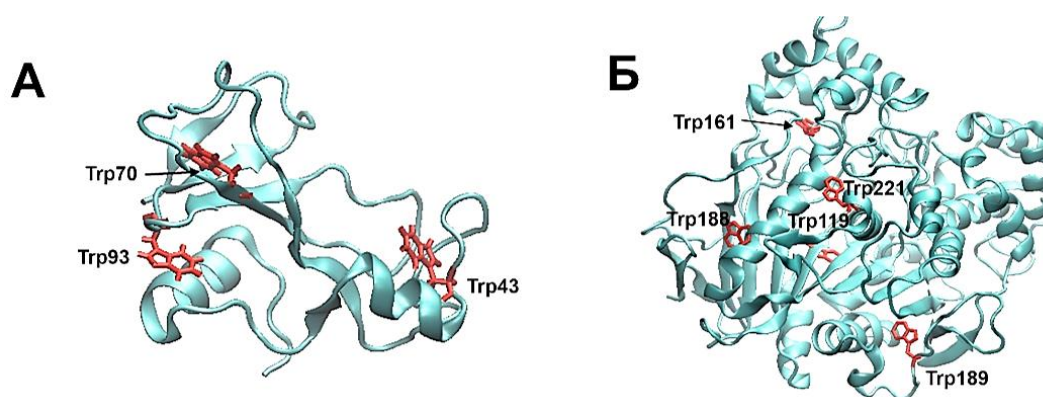


Рисунок 3.34– Третичная структура (А) биназы и (Б) липазы с расположением остатков триптофана.

На рисунке 3.35 и в таблице 3.3 показаны результаты разложения суммарного спектра флуоресценции биназы на отдельные компоненты. Определен слабый прогрессивный голубой сдвиг максимума триптофана I класса (рисунке 3.35Б) при увеличении концентрации альгината и отсутствии явных изменений положения III класса. Гипсохромный (голубой) сдвиг свидетельствует о компактизации молекулы фермента при взаимодействии с полисахаридной матрицей.

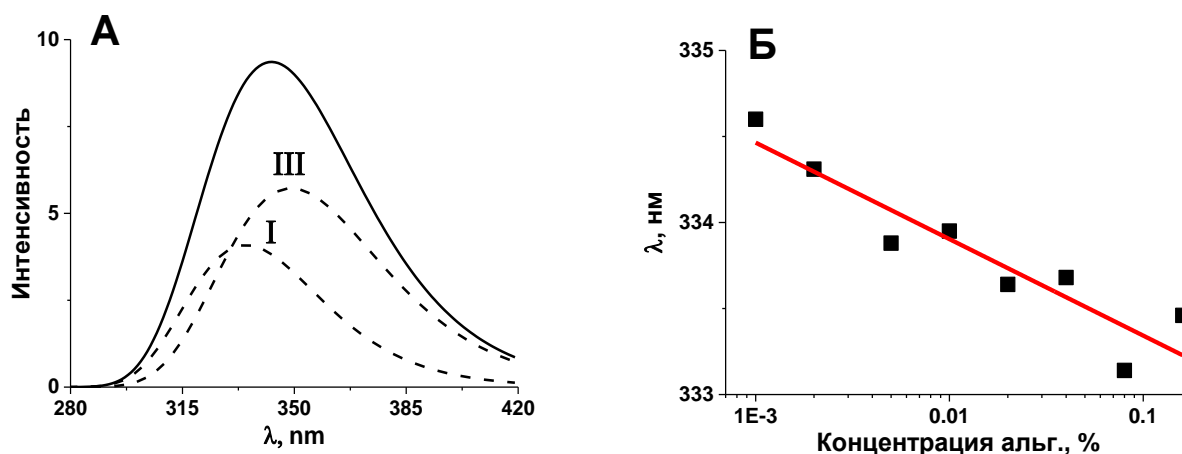


Рисунок 3.35 – (А) Разложение спектра флуоресценции биназы в альгинате натрия на две компоненты с максимумами 334.8 нм (триптофан класса I) и 349.0 нм (триптофан класса III); (Б) положение максимума триптофана класса I в зависимости от концентрации альгината.

Таблица 3.3 – Положение максимума суммарной флуоресценции ( $\lambda_{\text{макс}}$ ) остатков триптофанов биназы и положения максимумов отдельных компонент ( $\lambda_{\text{макс}}^{\text{I}}$  и  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{III}}$ ) в растворах альгината натрия различной концентрации

$C_{\text{АН}}, \%$	$\lambda_{\text{макс}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{I}}, \text{нм}$	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{III}}, \text{нм}$
0	343	334.78	348.98
0.001	343	334.60	348.69
0.002	343	334.31	348.68
0.005	343	333.88	348.80
0.01	343	333.95	348.97
0.02	343	333.64	348.84
0.04	343	333.68	348.74
0.08	343	333.14	348.49
0.16	343	333.46	349.05

На рисунке 3.36 показано разложение на отдельные компоненты общего спектра флуоресценции липазы. Наблюдается батохромный (красный) сдвиг максимума суммарной флуоресценции на 5 нм, отдельных компонент – на 7 (триптофан класса III) и 3 нм (триптофан класса I).

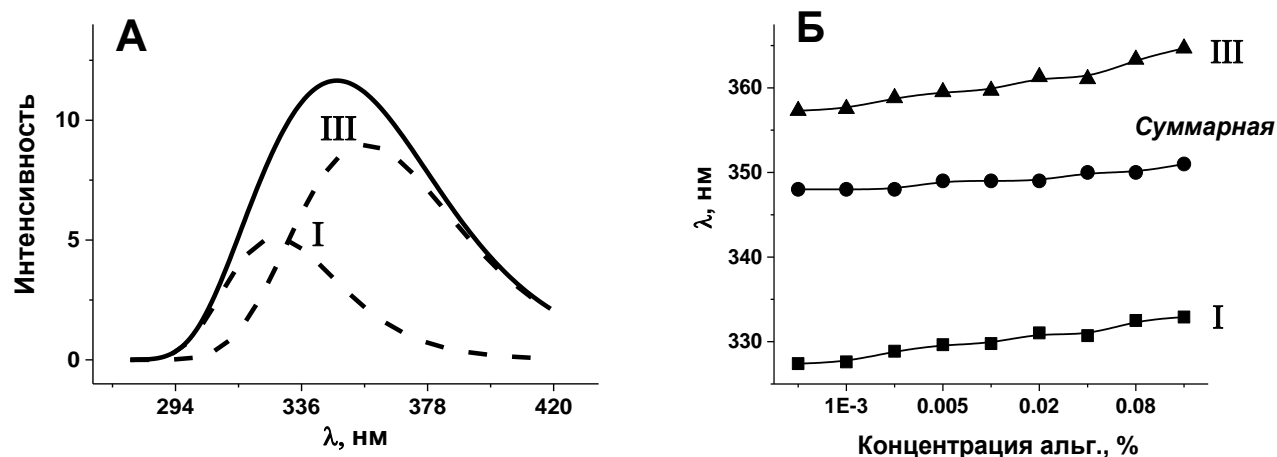


Рисунок 3.36 – (А) Разложение спектров флуоресценции липазы в альгинат натрия на две компоненты 334.8 (триптофан класса I) и 364.67 нм (триптофан класса III); (Б) положение максимума суммарной флуоресценции остатков триптофана липазы и максимумов отдельных компонент в растворах альгината натрия разной концентрации.

Таблица 3.4 – Положение максимумов суммарной флуоресценции ( $\lambda_{\text{макс}}$ ) остатков триптофана липазы и положения максимумов компонент ( $\lambda_{\text{макс}}^{\text{I}}$  и  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{III}}$ ) в растворах альгината натрия разной концентрации

$C_{\text{АН}}, \%$	$\lambda_{\text{макс}}, \text{nm}$	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{I}}, \text{nm}$	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{III}}, \text{nm}$
0	348	327.41	357.3
0.001	348	327.61	357.53
0.002	348	328.87	358.8
0.005	349	329.64	359.52
0.01	349	329.78	359.68
0.02	349	331.04	361.3
0.04	350	330.71	361.06
0.08	350	332.5	363.35
0.16	351	332.91	364.67

Такие существенные сдвиги свидетельствуют о значимом изменении микроокружения триптофановых остатков липазы на более полярное (рис 3.36Б, табл. 3.4). Это может быть вызвано разворачиванием белка вследствие взаимодействия с альгинатом натрия. Это классическое явление для липазы, чьей отличительной особенностью является конформационная перестройка при контакте с поверхностью

раздела фаз. Очевидно, альгинат натрия выполняет роль активирующей поверхности и зафиксированные структурные изменения липазы не должны уменьшать ее активность.

### 3.9 Цитотоксичность белок-полисахаридных гидрогелей в присутствии углеродных нанотрубок

Для оценки потенциальных возможностей сконструированных контейнеров для БАВ необходимо оценить цитотоксические свойства всех компонентов. Характеристику изменений жизнеспособности клеток раковой опухоли шейки матки человека HeLa и аденокарциномы легких человека A549 осуществляли с помощью МТТ-теста. Результаты исследования токсичности двухвалентных катионов металлов приведены на рис. 3.37. Из рассматриваемых нами ранее катионов мы выбрали  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ , так как данные катионы являются биогенными элементами и важными металлами, необходимыми для нормального протекания процессов в живых организмах (Huang *et al.*, 2020). Остальные катионы такие как  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$  являются слишком токсичными и их применение для биотехнологических конструкций требует отдельного рассмотрения.

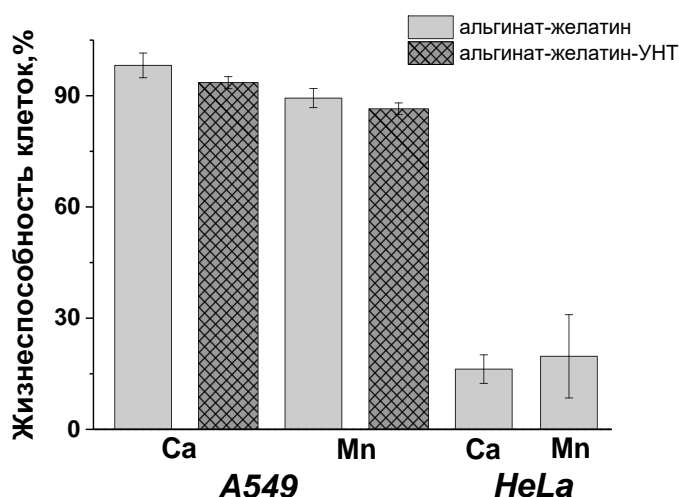


Рисунок 3.37 – Жизнеспособность клеток HeLa и A549 в альгинат-желатиновых и альгинат-желатиновых-УНТ системах (сферы).

Как следует из рис. 3.37 специфика токсического действия ионов Ca и Mn сильно различается для разных клеток. В отличие от клеток HeLa, когда выживаемость составляла  $16.2 \pm 3.8$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) и  $19.7 \pm 2.7\%$  ( $\text{Mn}^{2+}$ ) клетки аденокарциномы легких человека линии A549 слабо чувствительны к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ , выживаемость клеток составила  $98 \pm 3.3\%$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) и  $89 \pm 2.5\%$  ( $\text{Mn}^{2+}$ ), а добавление УНТ незначительно увеличивало цитотоксичность исследуемой системы,  $93.5 \pm 1.6$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) и  $86.5 \pm 1.5\%$  ( $\text{Mn}^{2+}$ ). Таким образом, можно сделать вывод, что сферы на основе альгинат-желатина, стабилизированные катионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ , в дальнейшем можно использовать в качестве систем для инкапсуляции цитотоксичной РНКазы *Bacillus pumilus*.

Цитотоксичность к-каррагинановых гелей протестирована по отношению к клеткам HeLa. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что сформированные гели обладают низкой токсичностью. Данный факт можно объяснить тем, что формирование и стабилизация сфер к-каррагинан-желатин происходит только при изменении температуры и не требует присутствия двухвалентных катионов (рис. 3.38). При этом существует небольшая тенденция к усилению токсических свойств данной системы с увеличением концентрации гидрогеля в тестируемой системе.

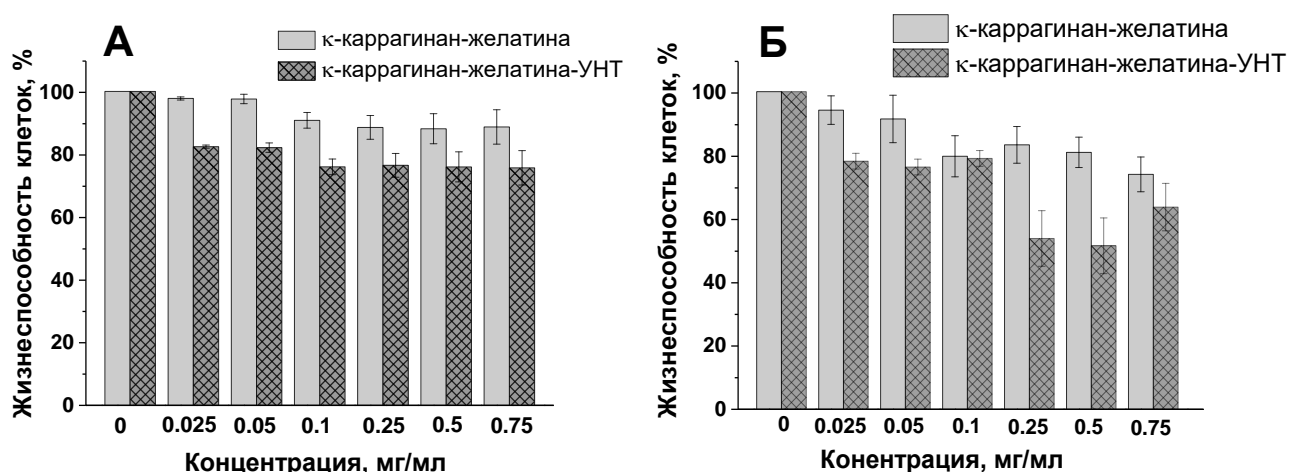


Рисунок 3.38 – Влияние используемой концентрации гидрогеля и УНТ на жизнеспособность клеток HeLa в к-каррагинан-желатиновом геле (А) в присутствии и (Б) отсутствии фетальной сыворотки.



УНТ показали хорошую биосовместимость с сохранением 98% клеточной активности HeLa при концентрации 0.005 мг/мл (при добавлении фетальной сыворотки активность клеток составила 100%), при увеличении концентрации УНТ до 0.25 мг/мл жизнеспособность клеток была около 85%, а при добавлении сыворотки активность клеток составляла 98% (рис. 3.39). Добавление фетальной сыворотки (ФС) к культуральной среде полностью сняло токсичность УНТ, что согласуется с литературными данными (Clift *et al.*, 2010).

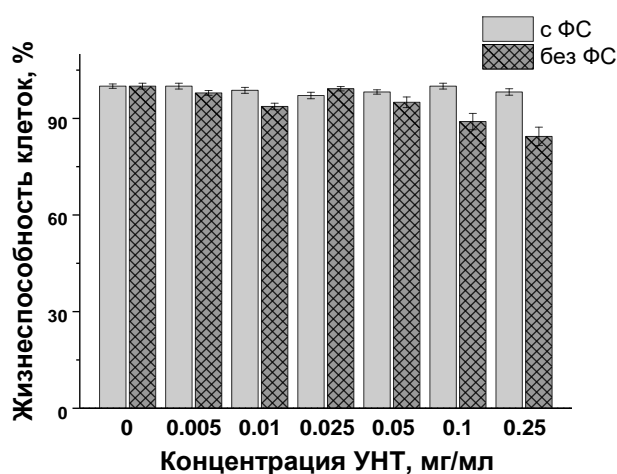


Рисунок 3.39 – Жизнеспособность клеток HeLa в зависимости от концентрации УНТ в присутствии и в отсутствие фетальной сыворотки (ФС).

Таким образом, в настоящем разделе показано, что за исключением сильного токсического действия  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  в отношении клеток HeLa 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. Нами показано, что наличие фетальной сыворотки в среде культивирования клеток снижает токсичное действие УНТ, что ранее наблюдалось и для других систем (Yuan *et al.*, 2019). Поскольку биосовместимость является важнейшей характеристикой материалов, которые планируются к использованию в биомедицине, особенно в условиях *in vivo*, таким

образом улучшая биосовместимость УНТ можно расширить возможности их применения в биомедицинской области (Li *et al.*, 2020).

## 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 κ-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 вязкости 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 состояние.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. – № 3. – С. 590-595.
2. Богданова, Л.Р. Структура и свойства ферментативного микрореактора «липаза в полисахаридном гидрогеле» / Л. Р. Богданова, А. М. Рогов, О. С. Зуева, Ю. Ф. Зуев // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2019. – № 2. – С. 400-404.
3. Бокий, Г.Б. Рентгеноструктурный анализ / Г.Б. Бокий, М.А. Порай-Кошиц // – М. Изд-во МГУ. – 1964. – Т. 1. – 490 с.
4. Ермак, И.М. Структурные особенности и биологическая активность каррагинанов-сульфатированных полисахаридов красных водорослей дальневосточных морей России / И.М. Ермак, А.О. Бянкина (Барабанова), Е.В. Соколова // Вестник ДВО РАН. – 2014. – Т. 1. – № 173. – С. 80-92.
5. Зегря, Г. Нанотехнологии в биологии и медицине / Г. Зегря, Н. Ерофеев, Д. Вчерашний. – Санкт–Петербург: Санкт–Петербург. – 2009. – 320 с.
6. Зезин, А., Кабанов В. Новый класс комплексных водорастворимых полиэлектролитов. Успехи химии. – 1982. – Т. 9. – С. 1447-1478.
7. Зуева, О.С. Структура и свойства водных дисперсий додецилсульфата натрия с углеродными нанотрубками // О.С. Зуева, О.Н. Макшакова, Б.З. Идиятуллин, Д.А. Файзуллин, Н.Н. Беневоленская, А.О. Боровская, Э.А. Шарипова, Ю.Н. Осин, В.В. Сальников, Ю.Ф. Зуев // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2016. – № 65. – С. 1208.
8. 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. – № 3. – С. 581-589.

9. Измайлова, В.Н. Свойства межфазных слоев в многокомпонентных системах, содержащих желатину / В. Н. Измайлова // Коллоидный журнал. – 2000. – Т. 62. – № 6. – С. 725-748.
10. Измайлова, В.Н. Структурообразование в белковых системах / В.Н. Измайлова, П.А. Ребиндер. // М.: Наука. – 1974. – 268 с.
11. Кулезнев, В.Н. Химия и физика полимеров / В.Н. Кулезнев, В.А. Шершнев. – М.: Высшая школа. – 1988. – 312 с.
12. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович – М.: Мир. – 1986. – 496 с.
13. Сарычев А.К. Электродинамика метаматериалов / А.К. Сарычев, В.М. Шалаев // М: Научный мир. – 2011. – 221 с.
14. Свергун, Д.И. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние / Д. И.Свергун, Л. А. Фейгин, Д. И. Свергун, Л. А. Фейгин– М.: Наука. – 1986. – 279 с.
15. Хохлов, А.Р. Самоорганизация в ион-содержащих полимерных системах / А.Р. Хохлов, Е.Е. Дормидонтова // Успехи физических наук. – 1997. – № 167. – С. 113-128.
16. Abdulrazzak, F. H. Behavior of X-Ray Analysis of Carbon Nanotubes / F. H. Abdulrazzak, A.F. Alkiam, F.H. Hussein // Perspective of Carbon Nanotubes – 2019. – Chapter 7. – P. 1-16.
17. Agarwal, P. Aspergillus niger PA2 Tyrosinase Covalently Immobilized on a Novel Eco-Friendly Bio-Composite of Chitosan-Gelatin and Its Evaluation for L-DOPA Production / P. Agarwal, S. Dubey, M. Singh, R.P. Singh // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 1-10.
18. Ahlqvist, J. Affinity binding of inclusion bodies on supermacroporous monolithic cryogels using labeling with specific antibodies / J. Ahlqvist, A. Kumar, H. Sundstrom, E. Ledung, E.G. Hornsten, S.O. Enfors, B. Mattiasson // Journal of Biotechnology. – 2006. – Vol. 122. – N. 2. – P. 216-225.
19. Ahmed, R.G. Maternal Hypothyroidism and Lung Dysfunction / R.G. Ahmed // International Journal of Research Studies in Medical and Health Sciences. – 2017. – Vol. 2 – N. 11. – P. 8-11.



20. Al Mahmud, K.A.H. On the Molecular Level Cavitation in Soft Gelatin Hydrogel / K.A.H. Al Mahmud, F. Hasan, M.I. Khan, A. Adnan // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – N. 1. – P. 9635.
21. Ali, I. Rheological investigation of the viscoelastic thixotropic behavior of synthesized polyethylene glycol-modified polyacrylamide hydrogels using different accelerators / Ali I., Shah L.A. // *Polym. Bull.* – 2021. – Vol. 78. – P. 1275-1291.
22. Al-Nimry, S. Cosmetic, biomedical and pharmaceutical applications of fish gelatin/hydrolysates / S. Al-Nimry, A.A. Dayah, I. Hasan, R. Daghmash // *Marine Drugs*. – 2021. – Vol. 19 – N. 3. – P. 145.
23. Andrews, A.T. Electrophoresis / A.T. Andrews // Oxford: Clarendon. – 1986. – 452 p.
24. Ariga, K. Layer-by-layer assembly for drug delivery and related applications / K. Ariga, M. McShane, Y. Lvov, Q. Ji, J. Hill // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2011. – Vol. 8. – P. 633-644.
25. Balakrishnan, B. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin / B. Balakrishnan, M. Mohanty, P. Umashankar, A. Jayakrishnan // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26. – N. 32. – P. 6335-6342.
26. Ballester, S.I.L. Gelation of Undenatured Proteins with Polysaccharides / S.I.L. Ballester, S.L. Turgeon, C. Sanchez, P. Paquin // *Google Patents*. – 2005.
27. Barba, F.J. Evaluation of quality changes of blueberry juice during refrigerated storage after high-pressure and pulsed electric fields processing / F.J. Barba, H. Jäger, N. Meneses, M.J. Esteve, A. Frígola, D. Knorr // *Innov Food Sci Emerg Technol.* – 2012. – Vol. 14. – P. 18-24.
28. Bardajee, R.G. Novel highly swelling nanoporous hydrogel based on polysaccharide/protein hybrid backbone / R.G. Bardajee, A. Pourjavadi, R. Soleyman // *Journal of Polymer Research*. – 2010. – Vol. 8. – N. 3. – P. 337-346.
29. Basavegowda, N. Advances in Functional Biopolymer-Based Nanocomposites for Active Food Packaging Applications / N. Basavegowda, K.-H. Baek // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13. – P. 4198.
30. Bealer, E.J. Protein–Polysaccharide Composite Materials: Fabrication and

Applications / E.J. Bealer, S. Onissema-Karimu, A. Rivera-Galletti, M. Francis, J. Wilkowski, D. Salas-de la Cruz, X. Hu // *Polymers*. – 2020. – Vol. 12. – P. 464.

31. Benmouna, F. Viscoelasticity of gelatin surfaces probed by AFM noise analysis / F. Benmouna, D. Johannsmann // *Langmuir*. – 2004. – Vol. 20. – P. 188-193.

32. Ben-Naim, A. Hydrophobic Interaction / A. Ben-Naim // Plenum Press, New York. – 1980. – 311 p.

33. Berger, A.N. Further Evidence on the Link between Finance and Growth: An International Analysis of Community Banking and Economic Performance / A.N. Berger, H. Iftekhar, L.F. Klapper // *Journal of Financial Services Research*. – 2004. – Vol. 25. – P. 169-202.

34. Bogdanova, L.R. Micellar catalytic effect as a factor of lipase activity regulation / L.R. Bogdanova, E.A. Ermakova, B.Z. Idiyatullin, Yu.F. Zuev, L.Y. Zakharova, A.I. Konovalov // *Dokl Biochem Biophys*. – 2012. – Vol. 446. – P. 238-341.

35. Bohidar, H.B. Hydrodynamic properties of gelatin in dilute solutions / H.B. Bohidar // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 1998. – Vol. 23. – N. 1. – P. 1-6.

36. Bonferoni, M.C. Carrageenan–gelatin mucoadhesive systems for ion-exchange based ophthalmic delivery: in vitro and preliminary in vivo studies / M.C. Bonferoni, P. Chetoni, P. Giunchedi, S. Rossi, F. Ferrari, S. Burgalassi, C. Caramella // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2004. – Vol. 57. – N. 3. – P. 465-472.

37. Boontheekul, T. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution / T. Boontheekul, H.-J. Kong, D.J. Mooney // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26. – N. 15. – P. 2455-2465.

38. Bordas, J. Stages of tubulin assembly and disassembly studied by time-resolved synchrotron X-ray scattering / J. Bordas, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow. // *Journal of Molecular Biology* – 1983. – Vol. 164. – P. 80-135.

39. Bouhadir, K.H. Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents / K.H. Bouhadir, E. Alsberg, D.J. Mooney // *Biomaterials*. – 2001. – Vol. 22. – P. 2625-2633.

40. Brinker, C.J. Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol Gel Processing. San-Diego / C.J. Brinker, G.W. Scherer // Academic Press. – 1990 – 908 p.
41. Bromberg, L.E. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery / L.E. Bromberg, E.S. Ron // Advanced Drug Delivery Review. – 1998. – Vol. 31. – P. 197-221.
42. Burstein, E.A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. I. Decomposition algorithms / E.A. Burstein, S.M. Abornev, Ya.K. Reshetnyak // Biophysical Journal. – 2001. – Vol. 81. – P. 1699-709.
43. Buschmann, M. M. Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux / M.M. Buschmann, L. Shen, H. Rajapakse, D.R. Raleigh, Y. Wang, Y. Wang, A. Lingaraju, J. Zha, E. Abbott, E.M. McAuley, L.A. Breskin, L. Wu, K. Anderson, J.R. Turner, C.R. Weber // Molecular Biology of the Cell. – 2013. – Vol. 24. – N. 19. – P. 3056-3068.
44. Bushell, G.C. On techniques for the measurement of the mass fractal dimension of aggregates / G.C. Bushell, Y.D. Yan, D. Woodfield, J. Raper, R. Amal // Advances in Colloid and Interface Science. – 2002. – Vol. 95. – P. 1-50.
45. Çakır, E. Combining protein micro-phase separation and protein-polysaccharide segregative phase separation to produce gel structures / E. Çakır, E.A. Foegeding // Food Hydrocolloids. – 2011. – Vol. 25. – N. 6. – P. 1538-1546.
46. Cao, Y. Mapping the Complex Phase Behaviors of Aqueous Mixtures of  $\kappa$ -Carrageenan and Type B Gelatin / Y. Cao, L. Wang, K. Zhang, Y. Fang, K. Nishinari, G.O. Phillips // J. Phys. Chem. B. – 2015. – Vol. 119. – N. 30. – P. 9982-9992.
47. Cebi, N. An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins / N. Cebi, M. Z. Durak, O. S. Toker, O. Sagdic, M. Arici // Food Chem. – 2016. – Vol. 190. – P. 1109-1115.
48. Chan, A.W. Tuneable semi-synthetic network alginate for absorptive encapsulation and controlled release of protein therapeutics / A.W. Chan, R.J. Neufeld // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31. – P. 9040-9047.
49. Chen, D. Dimension reduction of decision variables for multireservoir

operation: A spectral optimization model / D. Chen, A. S. Leon, N. L. Gibson, P. Hosseini // *Water Resour. Res.* – 2016. – Vol. 52. – N. 1. – P. 36-51.

50. Chirani N. History and applications of hydrogels / N. Chirani, L. Yahia, L. Gritsch, F. Motta, S. Chirani, S. Faré // *J Biomed Sci.* – 2015. – Vol. 4. – N. 2. – P. 13-23.

51. Choi, B.Y. Preparation of alginate beads for floating drug delivery system: Effects of CO(2) gas-forming agents / B.Y. Choi, H.J. Park, S.J. Wang, J.B. Park // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2002. – Vol. 239. – P. 81-91.

52. Cirillo, G. Carbon Nanotubes Hybrid Hydrogels in Drug Delivery: A Perspective Review / G. Cirillo, S. Hampel, U.G. Spizzirri, O.I. Parisi, N. Picci, F. Iemma // *BioMed Research International.* – 2014. – P. 1-17.

53. Clift, M.J.D. The effects of serum on the toxicity of manufactured nanoparticles / M.J.D. Clift, S. Bhattajarhee, D.M. Brown, V. Stone // *Toxicology Letters.* – 2010. – Vol. 198. – P. 358-365.

54. da Silva Gasque, K.C. Cell density and solvent are critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay / K.C. da Silva Gasque; L.P. Al-Ahj; R.C. Oliveira; A.C. Magalhães // *Brazilian Archives of Biology and Technology* – 2014. – Vol. 57. – N. 3. – P. 381-385.

55. Das, N. Biomaterial hydrogels for different biomedical applications / N. Das, T. Bera, A. Mukherjee // *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* – 2012. – Vol. 3. – P. 586-595.

56. Dave, P.N. Natural Polysaccharide-Based Hydrogels and Nanomaterials / P.N. Dave, A. Gor // *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications.* – 2018. – P. 36-66.

57. Davoren, M. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells / M. Davoren, E. Herzog, A. Casey // *Toxicol. In Vitro.* – 2007. – Vol. 21. – N. 3. – P. 438-448.

58. Deng, Z. J. Layer-by-layer nanoparticles for systemic codelivery of an anticancer drug and siRNA for potential triple-negative breast cancer treatment / Z.J.

Deng, S.W. Morton, E. Ben-Akiva, E.C. Dreaden, K.E. Shopsowitz, P.T. Hammond // ACS Nano. – 2013. – Vol. 26. – P. 9571-9584.

59. Derkach, S.R. Molecular structure and properties of  $\kappa$ -carrageenan-gelatin gels / S.R. Derkach, N.G. Voron'ko, Y.A. Kuchina, D.S. Kolotova, A.M. Gordeeva, D.A. Faizullin, Y.A. Gusev, Yu.F. Zuev, O.N. Makshakova // Carbohydrate Polymers. – 2018. – Vol. 197. – P. 66-74.

60. Derkach, S.R. Polyelectrolyte Polysaccharide–Gelatin Complexes: Rheology and Structure / S.R. Derkach, Y.A. Kuchina, D.S. Kolotova, N.G. Voron'ko // Polymers. –2020. – Vol. 12. – N. 2. – P. 266.

61. Derkach, S.R. The rheological properties of gelatin gels containing  $\kappa$ -carrageenan. The role of polysaccharide / S.R. Derkach, N.G. Voron'ko, A.A. Maklakova, Y.V. Kondratyuk // Colloid Journal. – 2014. – Vol. 76. – N. 2. – P. 146-152.

62. Derkach, S.R. The rheology of gelatin hydrogels modified by  $\kappa$ -carrageenan. LWT / S.R. Derkach, S.O. Ilyin, A.A. Maklakova, V. G. Kulichikhin, A.Y. Malkin, // Food Science and Technology. – 2015. – Vol. 63. – N 1. – P. 612-619.

63. Di Lorenzo, F. Nanostructural heterogeneity in polymer networks and gels / F. Di Lorenzo, S. Seiffert // Polymer Chemistry. – 2015. – Vol. 6. – N. 31. – P. 5515-5528.

64. DIFFRAC Plus Evaluation package EVA. User's Manual, Bruker AXS, Karlsruhe, Germany. Version 11. – 2005. – P. 258.

65. Distantina, S. Preparation and characterization of glutaraldehyde-crosslinked kappa carrageenan hydrogel / S. Distantina, R. Rochmadi, M. Fahrurrozi, W. Wiratni // Engineering Journal. – 2013. – Vol. 17. – N. 3. – P. 57-66.

66. Dobrynin, A.V. Solutions of Charged Polymers / A.V. Dobrynin // Polymer Science: A Comprehensive Reference. –2012. – P. 81–132.

67. Dong, H. Biofilm polysaccharide display platform: A natural, renewable, and biocompatible material for improved lipase performance / H. Dong, W. Zhang, Y. Wang, D. Liu, P. Wang // J Agric Food Chem. – 2020. – Vol. 68. – P. 1373-1381.

68. Dong, J. Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity/ J. Dong, Q. Ma // Nanotoxicology. – 2015. – Vol. 9. – N. 5. – P. 658-

676.

69. Dong, S. A Dual-Responsive Supramolecular Polymer Gel Formed by Crown Ether Based Molecular Recognition / S. Dong, Y. Luo, X. Yan, B. Zheng, X. Ding, Y. Yu, Z. Ma, Q. Zhao, F. Huang // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2011. – Vol. 50. – 1905-1909.

70. Doumèche, B. Enzyme-catalyzed phase transition of alginate gels and gelatin-alginate interpenetrated networks / B. Doumèche, J. Picard, V. Larreta-Garde // *Biomacromolecules.* – 2007. – Vol. 8. – N. 11. – P. 3613-3618.

71. Draget, K.I. Effects of molecular weight and elastic segment flexibility on syneresis in Ca–alginate gels / K.I. Draget, O. Gaserød, I. Aune, P.O. Andersen, B. Storbakken, B.T. Stokke, O. Smidsrød, // *Food Hydrocolloids.* – 2001. – Vol. 15. – N. 4. – P. 485-490.

72. Dumeé, L. Control of Porosity and Pore Size of Metal Reinforced Carbon Nanotube Membranes / L. Dumeé, L. Velleman, K. Sears, M. Hill, J. Schutz, N. Finn, M. Duke, S. Gray // *Membranes.* – 2011. – Vol. 1. – P. 25-36.

73. Echave, M.C. Progress of gelatinbased 3D approaches for bone regeneration / M.C. Echave, P. Sánchez, J.L. Pedraz, G. Orive // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2017. – Vol. 42. – P. 63-74.

74. Eleya, M.O. Gelation of whey protein and xanthan mixture: Effect of heating rate on rheological properties / M.O. Eleya, S. Turgeon // *Food hydrocolloids.* – 2000. – Vol. 14. – N. 1. – P. 29-40.

75. Evmenenko, G. SANS study of surfactant ordering in  $\kappa$ -carrageenan/cetylpyridinium chloride complexes / G. Evmenenko, E. Theunissen, K. Mortensen, H. Reynaers // *Polymer.* – 2001. – Vol. 42. – N. 7. – P. 2907-2913.

76. Feigin, L.A. Structure analysis by small–angle X–ray and neutron scattering / L.A. Feigin, D.I. Svergun // *Plenum Press, New York.* – 1987. – 335 p.

77. Firme, C.P. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems / C.P. Firme, P.R. Bandaru // *Nanomedicine.* – 2010. – Vol. 6. – N. 2. – P. 245-256.

78. Fontes-Candiaa, C. Understanding nanostructural differences in hydrogels

from commercial carrageenans: Combined small angle X-ray scattering and rheological studies / C. Fontes-Candiaa, A. Strömb, L.G. Gómez-Mascaraquec, A. López-Rubioa, M. Martínez-Sanza // *Algal Research Volume*. – 2020. – Vol. 47. – P. 101882.

79. Gao, C.M. Preparation of oxidized sodium alginate–graftpoly ((2–dimethylamino) ethyl methacrylate) gel beads and in vitro controlled release behavior of BSA / C.M. Gao, M.Z. Liu, S.L. Chen, S.P. Jin, J. Chen // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2009. – Vol. 371. – P. 16-24.

80. Gelli, R. Multi-scale investigation of investigation of gelatin/poly(vinylalcohol) interactions in water / R. Gelli, S. Del Buffa, P. Tempesti, M. Bonini, F. Ridi, P. Baglioni // *Colloids and Surfaces A*. – 2017. – Vol. 532. – P. 18-25.

81. Ghobril, C. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial / C. Ghobril, M. W. Grinstaff // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – Vol. 44. – N. 7. – P. 1820-1835.

82. Ghosh, A.K. Polysaccharide-protein interactions and their relevance in food colloids / A.K. Ghosh, P. Bandyopadhyay // *INTECH Open Access Publisher*. – 2012. – Vol. 14. – P. 395-408.

83. Girard, M. Associative phase separation of blactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering / M. Girard, C. Sanchez, S.I. Laneuville, S.L., Turgeon, S.F. Gauthier // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2004. – Vol. 35. – P. 15-22.

84. Glatter, O. Small–angle X–ray scattering / O. Glatter, O. Kratky, H. C. Kratky – London: Academic Press. – 1982. – 515 p.

85. Glukhova, S.A. Printable Alginate Hydrogels with Embedded Network of Halloysite Nanotubes: Effect of Polymer Cross-Linking on Rheological Properties and Microstructure / S.A. Glukhova, V.S. Molchanov, B.V. Lokshin, A.V. Rogachev, A.A. Tsarenko, T.D. Patsaev, R.A. Kamyshinsky, O.E. Philippova // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13. – N. 23. – P. 4130.

86. Göbel, C. Large-scale heterogeneities in randomly cross-linked networks / C. Göbel, C. Hils, M. Drechsler, D. Baabe, A. Greiner, H. Schmalz, B. Weber // *Macromolecules*. – 1988. – Vol. 21. – N. 8. – P. 2647-2649.

87. Gómez–Guillen, C. Effect of heating temperature and sodium chloride concentration on ultrastructure and texture of gels made from giant squid (*Dosidicus gigas*) with addition of starch, l–carrageenan and egg white / C. Gómez–Guillen, T. Solas, J. Borderías, P. Montero // *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und–Forschung A*. – 1996. – Vol. 202. – N. 3. – P. 221-227.
88. Gong, J.P. Friction and lubrication of hydrogels—its richness and complexity / J.P. Gong // *Soft Matter*. – 2006. – Vol. 2. – N. 7. – P. 544-552.
89. Graupner, R. Surface-sensitive K-edge absorption spectroscopy on clean and hydrogen-terminated diamond (111) and (100) surfaces / R. Graupner, J. Ristein, L. Ley, Ch. Jung // *Phys. Rev.* – 1999. – Vol. 60. – N. 24. – P. 17023-17029.
90. Grinberg, V. Y. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions / V.Y. Grinberg, V.B. Tolstoguzov // *Food Hydrocolloids*. – 1997. – Vol. 11. – N. 2. – P. 145-158.
91. Guinier, A. Small-angle Scattering of X-rays / A. Guinier, G. Fournet // Wiley, NewYork. – 1955. – 268 p.
92. Gulrez, S.K.H. Hydrogels: Methods of Preparation, characterization and application. In *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering-From Analysis and Modeling to Technology Applications*. / S.K.H. Gulrez, S. Al-Assaf, G.O. Phillips // In Tech: Rijeka, Croatia. – 2011. – Chapter 5. – P. 117-151.
93. Gupta, N. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor / N. Gupta, V. Shai, R. Gupta // *Process Biochemistry*. – 2007. – Vol. 42. – P. 518-526.
- Hammouda, T. Apatite solubility in carbonatitic liquids and trace element partitioning between apatite and carbonatite at high pressure / T. Hammouda, J. Chantel, J.-L. Devidal, // *Geochim Cosmochim Ac.* – 2010. – Vol. 74. – P. 7220-7235.
94. Helminger, M. Synthesis and characterisation of gelatin-Based magnetic hydrogels / M. Helminger, B. Wu, T. Kollmann, D. Benke, D. Schwahn, V. Pipich, D. Faivre, D. Zahn, H. Cölfen // *Advanced Functional Materials*– 2014. – Vol. 24. – P. 3187-3196.
95. Hess, S.T. Ultra-high-resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy / S.T. Hess, T.P.K. Girirajan, M.D. Mason // *Biophys J.* – 2006.



– Vol. 91. – N. 11. – P. 4258-4272.

96. Higuchi, A. External stimulus-responsive biomaterials designed for the culture and differentiation of ES, IPS, and adult stem cells / A. Higuchi, Q.D. Ling, S.S. Kumar, Y. Chang, T.C. Kao, M.A. Munusamy, A.A. Alarfaj, S.T. Hsu, A. Umezawa // *Prog. Polym. Sci.* – 2014. – Vol. 39. – P. 1585-1613.

97. Hougaard, K.S. Effects of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice / K.S. Hougaard, P. Jackson, Z.O. Kyjovska, R.K. Birkedal, P.-J. De Temmerman, A. Brunelli, E. Verleysen, A.M. Madsen, A.T. Saber, G. Pojana, J. Mast, A. Marcomini, K.A. Jensen, H. Wallin, J. Szarek, A. Mortensen, U. Vogel // *Reproductive Toxicology.* – 2013. – Vol. 41. – P. 86-97.

98. Huang, H. A high Mn(II)-tolerance strain, *Bacillus thuringiensis* HM7, isolated from manganese ore and its biosorption characteristics / H. Huang, Y. Zhao, Z. Xu, Y. Ding, X. Zhou, M. Dong // *PeerJ.* – 2020. – Vol. 8. – P. 8589.

99. Huang, X. Emerging trends and research foci in gastrointestinal microbiome / X. Huang, X. Fan, J. Ying, S. Chen // *Journal of Translational Medicine.* – 2019. – Vol. 17. – N. 1. – P. 1-11.

100. Hung, K.-C. Fractal Structure of Hydrogels Modulates Stem Cell Behavior / K.-C. Hung, U.-S. Jeng, S. Hsu // *ACS Macro Lett.* – 2015. – Vol. 4. – P. 1056-1061.

101. Hyun, K. A review of nonlinear oscillatory shear tests: analysis and application of large amplitude oscillatory shear / K. Hyun, M. Wilhelm, C.O. Klein, K.S. Cho, J.G. Nam, K.H. Ahn, S.J. Lee, R.H. Ewoldt, G.H. McKinley // *Prog. Polym. Sci.* – 2011. – Vol. 36. – N. 12. – P. 1697-1753.

102. Jackson, P. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes / P. Jackson, N.R. Jacobsen, A.B. Anders; R. Birkedal, D. Kühnel, J. Alstrup, V. Keld, B. Ulla; H. Wallin // *Chemistry Central Journal.* – 2013. – Vol. 7. – P. 154.

103. Jin, W. Coupling process of phase separation and gelation in konjac glucomannan and gelatin system / W. Jin, W. Xu, H. Ge, J. Li, B. Li // *Food Hydrocolloids.* – 2015. – Vol. 51. – P. 188-192.

104. Jones, B.E. Gelatine: manufacture and physico-chemical properties. / B.E. Jones // *Pharmaceutical Capsules.* Pharmaceutical Press. – 2004. – P. 23-60.

105. Jones, C.D. Gels with sense: Supramolecular materials that respond to heat / C.D. Jones, J.W. Steed, A. Dawn, T. Shiraki, S. Haraguchi, S. Tamaru, S. Shinkai // *Chem.—Asian J.* – 2011. – Vol. 6. – P. 266-282.
106. Kabanov, V.A. Polyelectrolyte complexes in solution and in bulk / V.A. Kabanov // *Russian chemical review.* –2005. – Vol. 74. – N. 1. – P. 3-20.
107. Kabir, S.M.F. Cellulose-based hydrogel materials: chemistry, properties and their prospective applications / S.M.F. Kabir, P.P. Sikdar, B. Haque, M.A.R. Bhuiyan, A. Ali, M.N. Islam // *Progress in Biomaterials.* – 2018. – Vol. 7. – N. 3. – P. 153-174.
108. Kabiri, M. Preparation and characterization of absorbable hemostat crosslinked gelatin sponges for surgical applications / M. Kabiri; S. H. Emami; M. Rafinia; M. Tahriri // *Current Applied Physics.* – 2011. – Vol. 11. – N. 3. – P. 457-461.
109. Kasapis, S. Phase equilibria and gelation in gelatin/maltodextrin systems. Part 2. Polymer incompatibility in solution / S. Kasapis, E.R. Morris, I.T. Norton, M.J. Gidley // *Carbohydrate Polymers.* – 1993. – Vol. 21. – P. 249-259.
110. Kashyap, N. Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications / N. Kashyap, N. Kumar, M. Kumar // *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems.* – 2005. – Vol. 22. – P. 107-149.
111. Koch, M.H.J. The structure of chromatin and its condensation mechanism / M.H.J. Koch // *Journal of Applied Crystallography.* – 1989. – Vol. 25. – P. 155-165.
112. Kołodziejska, I. Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal / I. Kołodziejska, E. Skierka, M. Sadowska, W. Kołodziejski, C. Niecikowska // *Food Chemistry.* – 2008. – Vol. 107. – N. 2.– P. 700-706.
113. Konarev, P.V. PRIMUS: A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis / P.V. Konarev, V.V. Volkov, A.V. Sokolova, M.H.J. Koch, D.I. Svergun // *Journal of Applied Crystallography.* – 2003. – Vol. 36. – P. 1277-1282.
114. Kühbeck, D. Evaluation of the nitroaldol reaction in the presence of metal ion-crosslinked alginates / D. Kühbeck, J. Mayr, M. Häring, M. Hofmann, F. Quignard, D. Díaz Díaz // *New Journal of Chemistry.* – 2015. – Vol. 39. – N. 3. – P. 2306-2315.
115. Kumarathanan, P. Applicability of a high-throughput shotgun plasma protein screening approach in understanding maternal biological pathways relevant to infant birth

weight outcome / P. Kumarathasan, R. Vincent, D. Das, S. Mohottalage, E. Blais, K. Blank // *J Proteome*. – 2014. – Vol. 100. – P.136-146.

116. Kurinenko, B.M. Antitumor activity of ribonuclease *Bacillus intermedius* 7P. / B.M. Kurinenko, L.I. Sobchuk, S.A. Haibullina, S.I. Karpova // *Experimental oncology*. – 1988. – Vol. 6. P. 54-57.

117. Lan, Z. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood–testis barrier / Z. Lan, W.–X. Yang // *Nanomedicine*. – 2012. – Vol. 7. – N. 4. – P. 579-596.

118. Laneville, S.I. Gelation of native  $\beta$ -lactoglobulin induced by electrostatic attractive interaction with xanthan gum / S.I. Laneville, S.L. Turgeon, C. Sanchez, P. Paquin // *Langmuir*. – 2006. – Vol. 22. – N. 17. – P. 7351-7357.

119. Lanone, S. Determinants of carbon nanotube toxicity / S. Lanone, P. Andujar, A. Kermanizadeh, J. Boczkowski // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2013. – Vol. 65. – N. 15. – P. 2063-2069.

120. Le, X.T. Formation and functional properties of protein–polysaccharide electrostatic hydrogels in comparison to protein or polysaccharide hydrogels / X.T. Le, L.E. Rioux, S.L. Turgeon // *Advanced Colloid Interface Science*. – 2017. – Vol. 239. – P. 127-135.

121. Le, X.T. Rheological and structural study of electrostatic cross-linked xanthan gum hydrogels induced by  $\beta$ -lactoglobulin / X.T. Le, S.L. Turgeon // *Soft Matter*. – 2013. – Vol. 9. – N. 11. – P. 3063-3073.

122. Le, X.T. Textural and water binding behaviors of  $\beta$ -lactoglobulin-xanthan gum electrostatic hydrogels in relation to their microstructure/ X.T. Le, S.L. Turgeon // *Food Hydrocolloids*. – 2015. – Vol. 49. – N. 30. – P. 216-223.

123. Lee, K.Y. Hydrogels for tissue engineering / K.Y. Lee, D.J. Mooney // *Chem. Rev.* – 2001. – Vol. 101. – N. 7. – P. 1869-1880.

124. Levachev, S.M. Gelation in gelatin and gelatin-containing multicomponent blends / S.M. Levachev, G.P. Yampol'skaya, S.R. Derkach, N.G. Voron'ko, M.A. Sakvarelidze, V.N. Izmailova // *Polym. Sci. Ser. C*. – 2004. – Vol. 46. – P. 73.

125. Li, D. Surface modification of carbon nanotube with gelatin via mussel inspired method / D. Li, S. Li, J. Liu, L. Zhan, P. Wang, H. Zhu, J. Wei // *Materials Science and Engineering C*. – 2020. – Vol. 112. – P. 110887.
126. Li, H. Synthesis of a novel gelatin–carbon nanotubes hybrid hydrogel / H. Li, D.Q. Wang, B.L. Liu, L.Z. Gao // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2004. – Vol. 33. – N. 2. – P. 85-88.
127. Li, L. Carrageenan and its applications in drug delivery / L. Li, R. Ni, Y. Shao, S. Mao // *Carbohydrate Polymers*. – 2014. – Vol. 103. – P. 1-11.
128. Lillehei, P.T. A quantitative assessment of carbon nanotube dispersion in polymer matrices / P.T. Lillehei, J.–W. Kim, L.J. Gibbons, C. Park // *Nanotechnology* – 2009. – Vol. 20. – P. 325708.
129. Lim, Y.–M. Preparation and biocompatibility study of gelatin/kappa-carrageenan scaffolds / Y.–M. Lim, H.–J. Gwon, J.–H. Choi, J. Shin, Y.–C. Nho, S. I. Jeong, S. E. Kim // *Macromolecular Research*. – 2010. – Vol. 18. – N. 1. – P. 29-34.
130. Liu, S. A review of the application of atomic force microscopy (AFM) in food science and technology / S. Liu, Y. Wang // *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press. – 2011. – Chapter 6. – P. 201-240.
131. Liu, Z. Carboxylation of multiwalled carbon nanotube enhanced its biocompatibility with L02 cells through decreased activation of mitochondrial apoptotic pathway / Z. Liu, X. Dong, L. Song, H. Zhang, L. Liu, D. Zhu, C. Song, X. Leng // *J. Biomed Mater Res., Part A*. – 2014. – Vol. 102. – N. 3. – P. 665-673.
132. Ma, S. Structural hydrogels / S. Ma, B. Yu, X. Pei, F. Zhou // *Polymer*. – 2016. – Vol. 98. –P. 516-535.
133. Mac Donald, R.A. Carbon nanotubes increase the electrical conductivity of fibroblast-seeded collagen hydrogels / R. A. Mac Donald, C. M. Voge, M. Kariolis, J. P. Stegemann // *Acta Biomaterialia*. – 2008. – Vol. 4. – P. 1583-1592.
134. Mahajan, A., Functionalized carbon nanotubes as emerging delivery system for the treatment of cancer / A. Mahajan, K. Patharkar, Kuche, R. Maheshwari, P.K. Deb, K. Kalia, R.K. Tekade // *International Journal of Pharmaceutics* – 2018. – Vol. 548. – P. 540-558.

135. Maitra, J. Cross-linking in hydrogels – a review / J. Maitra, V.K. Shukla // American Journal of Polymer Science. – 2014. – Vol. 4. – P. 25-31.
136. Makshakova, O.N. Interaction-Induced Structural Transformations in Polysaccharide and Protein-Polysaccharide Gels as Functional Basis for Novel Soft-Matter: A Case of Carrageenans / O.N. Makshakova, Y.F. Zuev // Gels. – 2022. – Vol. 8. – N. 5. – P. 287.
137. Makshakova, O.N. Interplay between secondary structure and ion binding upon thermoreversible gelation of kappa-carrageenan / O.N. Makshakova, D.A. Faizullin, Y.F. Zuev // Carbohydrate Polymers. – 2020. Vol. 227 – P. 115342.
138. Manna, S.K. Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappaB in human keratinocytes / S.K. Manna, S. Sarkar, J. Barr // Nano Lett. – 2005. – Vol. 5. – N. 9. – P. 1676-1684.
139. Marques, C.F. Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review / C.F. Marques, G.S. Diogo, S. Pina, J.M. Oliveira, T.H. Silva, R.L. Reis // J Mater Sci Mater Med. – 2019. – Vol. 30. – N. 3. – P. 32.
140. Marrs, W.M. Interactions in Caseinate–Gelatin Systems / W.M. Marrs, A.M. Pegg // The Imaging Science Journal. – 1997. – Vol. 45. – P. 263-265.
141. Matsumoto, M. No toxicological effects on acute and repeated oral gavage doses of single-wall or multi-wall carbon nanotube in rats / M. Matsumoto, H. Serizawa, M. Sunaga, H. Kato, M. Takahashi, M. Hirata–Koizumi, A. Ono, E. Kamata, A. Hirose // Journal of Toxicological Sciences. – 2012. – Vol. 37. – N. 3. – P. 463-474.
142. Maziad, N.A. Radiation polymerization of hydrophilic monomers for producing hydrogel used in waste treatment processes / N.A. Maziad // Polymer–Plastics Technology and Engineering. – 2004. – Vol. 43. – P. 1157-1176.
143. McAulay, K. Controlling the Properties of the Micellar and Gel Phase by Varying the Counterion in Functionalised-Dipeptide Systems / K. McAulay, P.A. Ucha, H. Wang, A.M. Fuentes-Caparrós, L. Thomson, O. Maklad, N. Khunti, N. Cowieson, M. Wallace, H. Cui, R.J. Poole, A.Seddong, D.J. Adams // Chemical Communications. – 2020. – 1-5.

144. Melchels, F.P.W. Additive manufacturing of tissues and organs / F.P.W. Melchels, M.A.N. Domingos, T.J. Klein, J. Malda, P.J. Bartolo, D.W. Huttmacher // *Progress in Polymer Science*. – 2012 – Vol. 37. – N. 8. – P. 1079-1104.
145. Michon, C. Study of the compatibility/incompatibility of gelatin/iota-carrageenan/water mixtures. / Michon C., Cuvelier G., Launay B., Parker A. and Takerkart G. // *Carbohydrate Polymers*. – 1995. – Vol. 28. – P. 333-336.
146. Michon, C. Viscoelastic properties of i-carrageenan/gelatin mixtures / C. Michon, G. Cuvelier, B. Launay, A. Parker // *Carbohydrate Polymers*. – 1996. – Vol. 31. – N. 3. – P. 161-169.
147. Mishra, S. Entrapment of *Saccharomyces cerevisiae* and 3T3 fibroblast cells into blue light cured hydrogels / S. Mishra, F.J. Scarano, P. Calvert // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2012. – Vol. 100A. – N. 10. – P. 2829-2838.
148. Mohite, P.B. A hydrogel: methods of preparation and applications / P.B. Mohite, S.S. Adhav // *International Journal of Advanced Pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 06. – P. 79-85.
149. Montero, P. Effects of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> on gels formed from fresh mince containing a carrageenan or alginate / P. Montero, M. Pe // *Food Hydrocoll.* – 2002. – Vol. 16. – P. 375-385.
150. Morris, J.M. Accessibility indicators for transport planning / J.M. Morris, P.L. Dumble, M.R. Wigan // *Transportation Research Part A: General*. – 1979. – Vol. 13. – N. 2. – P. 91-109.
151. Nan, X. Effect of surfactant functionalization of multi-walled carbon nanotubes on mechanical, electrical and thermal properties of epoxy nanocomposites / X. Nan, J. Ma, J. Liu, J. Zhao, W. Zhu // *Fibers and Polymers*. – 2016. – Vol. 17. – N. 11. – P. 1866-1874.
152. Naziha, C. History and applications of hydrogels / C. Naziha, Hocine, L.Y., Lukas, G., Federico, L.M., Soumia, C., Silvia, F. // *Journal of Biomedical Science*. – 2015. – Vol. 4. – P. 2-13.
153. Norton, A.B. Poly (vinyl alcohol) modification of low acyl gellan hydrogels for applications in tissue regeneration / A.B. Norton, R.D. Hancocks, L.M. Grover // *Food*

Hydrocolloids. – 2014. – Vol. 42. – N. 3. – P. 373-377.

154. Otterloo, J. Rheology of pig skin gelatine: Defining the elastic domain and its thermal and mechanical properties for geological analogue experiment applications / J. Otterloo, A.R. Cruden // *Tectonophysics*. – 2016. – Vol. 683. – P. 86-97.

155. Owens, G.J. Sol–gel based materials for biomedical applications / G.J. Owens, R.K. Singh, F. Foroutan, M. Alqaysi, C.-M. Han, C. Mahapatra, J.C. Knowles // *Progress in Materials Science*. – 2016. – Vol. 77. – P. 1-79.

156. Padhi, J.R. Development of highly biocompatible Gelatin & i-Carrageenan based composite hydrogels: In depth physiochemical analysis for biomedical applications / J.R. Padhi, D. Nayak, A. Nanda, P.R. Rauta, S. Ashe, B. Nayak // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – Vol. 153. – P. 292-301.

157. Pan, A. Uptake and Release of Species from Carbohydrate Containing Organogels and Hydrogels / A. Pan, S. G. Roy, U. Haldar, R. D. Mahapatra, G. R. Harper, W. L. Low, J. G. Hardy // *Gels*. – 2019. – Vol. 5. – N. 4. – P. 43.

158. Panouillé, M. Gelation behaviour of gelatin and alginate mixtures / M. Panouillé, V. Larreta-Garde // *Food Hydrocolloids*. – 2009. – Vol. 23. – N. 4. – P. 1074-1080.

159. Patent AU 2006244662 B2. Process for adsorption- based separation of bioparticles from an aqueous suspension / B. Mattiasson, I.Yu. Galaev, A. Kumar, M.B. Dainiak. –2005. – N. 0501088-9. – 24 p.

160. Pẽna, J. Computing general static-arbitrage boundsfor European basket options via Dantzig-Wolfe decomposition / J. Pẽna, X. Saynac, J.C. Vera, L.F. Zuluaga // *Algorithmic Oper. Res*. – 2010. – Vol. 5. – P. 65-74.

161. Peak, C.W. A review on tough and sticky hydrogels / C.W. Peak, J.J. Wilker, G. Schmidt // *Colloid Polym Sci*. – 2013. – N. 291. – P. 2031-2047.

162. Peppas, N. Physicochemical, foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology / N. Peppas, Y. Huang, M. Torres–Lugo, J. Ward, J. Zhang // *Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2000. – Vol. 2. – P. 9-29.

163. Peppas, N.A. Solute diffusion in hydrophilic network structures, in *Hydrogels in Medicine and Pharmacy* / N.A. Peppas, S.R. Lustig // CRC Press. – 1986. – Vol. 1. – P. 57-84.
164. Petka, W.A. Reversible hydrogels from selfassembling artificial proteins / W.A. Petka, J.L. Harden, K.P. McGrath, D. Wirtz, D.A. Tirrell // *Science*. – 1998. – Vol. 281. – P. 389-392.
165. Petoukhov, M.V. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis / M.V. Petoukhov, D. Franke, A.V. Shkumatov, G. Tria, A.G. Kikhney, M. Gajda, C. Gorba, H.T.D. Mertens, P.V. Konarev, D.I. Svergun. // *Journal of Applied Crystallography* – 2012. – Vol. 45. – P. 342-350.
166. Popov, A.M. Biocompatibility and applications of carbon nanotubes in medical nano robots / A.M. Popov, Y.E. Lozovik, S. Fiorito, L. Yahia // *International journal of nanomedicine*. – 2007. – Vol. 2, – N. 3. – P. 361-372.
167. Prasedya, E.S. Carrageenan delays cell cycle progression in human cancer cells in vitro demonstrated by FUCCI imaging / E.S. Prasedya, M. Miyake, D. Kobayashi, A. Hazama // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2016. – Vol. 16. – N. 1. – P. 270.
168. Pulskamp, K. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants / K. Pulskamp, S. Diabate, H.F. Krug // *Toxicol. Lett.* – 2007. – Vol. 168. – P. 2. – P. 58-74.
169. Ramachandran, G. *Treatise on Collagen* / G. Ramachandran // Academic Press, London and New York. – 1967. – 556 p.
170. Rhein-Knudsen, N. Seaweed Hydrocolloid Production: An Update on Enzyme Assisted Extraction and Modification Technologies / N. Rhein-Knudsen, M. Ale, A. Meyer // *Marine Drugs*. – 2015. – Vol. 13. – N. 6. – P. 3340-3359.
171. Rhim, J.W. Effect of PLA lamination on performance characteristics of agar/ $\kappa$ -carrageenan/clay bio-nanocompositefilm / J.W. Rhim // *Food Research International* – 2013. – Vol. 51. – P. 714-722.
172. Rokhade, A.P. Synthesis and characterization of semiinterpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled



release of acyclovir / A.P. Rokhade, S.A. Patil, T.M. Aminabhavi // Carbohydrate Polymers. – 2007. – Vol. 67. – P. 605-613.

173. Rosiak, J.M. Hydrogels and their medical applications / J.M. Rosiak, F. Yoshii // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. – 1999. – Vol. 151. – P. 56-64.

174. Roy, S. Gelatin/Carrageenan-Based Functional Films with Carbon Dots from Enoki Mushroom for Active Food Packaging Applications / S. Roy, P. Ezati, J. Rhim // W. ACS Appl. Polym. Mater. – 2021. – Vol. 3. – P. 6437–6445.

175. Russo, R. Effect of cross-linking with calcium ions on the physical properties of alginate films / R. Russo, M. Malinconico, G. Santagata, // Biomacromolecules. – 2007. – Vol. 8. – N. 10. – P. 3193-3197.

176. Safavi-Mirmahalleh S.A. Effect of surface chemistry and content of nanocrystalline cellulose on removal of methylene blue from wastewater by poly(acrylic acid)/nanocrystalline cellulose nanocomposite hydrogels / S.A. Safavi-Mirmahalleh, M. Salami-Kalajahi, H. Roghani-Mamaqani // Cellulose. – 2019. – Vol. 26. – P. 5603-5619.

177. Saleh, T.A. The Role of Carbon Nanotubes in Enhancement of Photocatalysis / T.A. Saleh // Syntheses and Applications of Carbon Nanotubes and Their Composites. – 2013. – Vol. 21. – P. 479-493.

178. Saleh, T.A., Functionalization of tungsten oxide into MWCNT and its application for sunlight-induced degradation of rhodamine B / T.A., Saleh, V.K. Gupta // Journal of Colloid and Interface Science. – 2011. – Vol. 362. – N. 2. – P. 337-344.

179. Santos, E.L. Coconut meal levels in ration for fingerling Nile tilapia / E.L. Santos, M. do C. Ludke, J.M. Barbosa, C.B.V. Rabello, J.V. Ludke, W. de M. C. Winterle, E.G. da Silva // Rev. Bras. Saude Prod. Anim. – 2009. – Vol. 10. -N. 2. – P. 390-397.

180. SASView 3.0.0 University of Tennessee. – 2009-2013.

181. Sathuvan, M.  $\kappa$ -Carrageenan: An effective drug carrier to deliver curcumin in cancer cells and to induce apoptosis / M. Sathuvan, R. Thangam, M. Gajendiran, R. Vivek, S. Balasubramanian, S. Nagaraj, P. Gunasekaran, B. Madhan, R. Rengasamy // Carbohydrate Polymers. – 2017. – Vol. 160. – P. 184-193.

182. Sato, T. Double-Stranded Helix of Xanthan in Dilute Solution: Further Evidence / T. Sato, S. Kojima, T. Norisuye, H. Fujita // *Polym J.* – 1984. – Vol. 16. – N. 5. – P. 423-429.
183. SAXS Version 4.0, Software Reference Manual, M86E00005 – 0600, Bruker AXS Inc., Madison (USA). – 2000.
184. Schaefer, D.W. Fractal geometry of silica condensation polymers / D.W. Schaefer, K.D. Keefer // *Phys. Rev. Lett.* – 1984. – Vol. 53. – N. 14. – P. 1383-1386.
185. Schaefer, D.W. Fractal models and the structure of materials / D.W. Schaefer // *MRS Bull.* – 1988. – Vol. 13. – P. 22-27.
186. Schicher, M. Functional proteomic analysis of lipases and esterases in cultured human adipocytes / M. Schicher, M. Morak, R. Birner-Gruenberger, H. Kayer, B. Stojcic, G. Rechberger // *J Prot Research.* – 2010. – Vol. 9. – P. 6334-6344.
187. Schulga, A. Comparative study of binase and barnase: experience in chimeric ribonucleases / A. Schulga, F. Kurbanov, M. Kirpichnikov, I. Protasevich, V. Lobachov, B. Ranjbar, V. Chekhov, K. Polyakov, Y. Engelborghs, A. Makarov // *Protein Engineering.* – 1998. – Vol. 11. – N. 9. – P. 773-780.
188. Serrano-Sevilla, I. Natural Polysaccharides for siRNA Delivery: Nanocarriers Based on Chitosan, Hyaluronic Acid, and Their Derivatives / I. Serrano-Sevilla; Á. Artiga; S.G. Mitchell; L. De Matteis; J.M. de la Fuente // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24. – P. 2570.
189. Shibayama, M. Small-angle neutron scattering on polymer gels: phase behavior, inhomogeneities and deformation mechanisms / M. Shibayama // *Polymer Journal.* – 2010. – Vol. 43. – N. 1. – P. 18-34.
190. Simon, A. Effects of multiwalled carbon nanotubes and triclocarban on several eukaryotic cell lines: elucidating cytotoxicity, endocrine disruption, and reactive oxygen species generation / A. Simon, S.X. Maletz, H. Hollert, A. Schäffer, H.M Maes // *Nanoscale Research Letters.* – 2014. – Vol. 9. – P. 396.
191. Simon, J. Overview of Carbon Nanotubes for Biomedical Applications / J. Simon, E. Flahaut, M. Golzio // *Materials.* – 2019. – Vol. 12. – P. 624.
192. Simson, J.A. Polysaccharide hydrogels for regenerative medicine

applications / J.A. Simson, J.H. Elisseeff // *Biomaterials and Regenerative Medicine*. – 2015. – Vol.3. – P. 247-262.

193. Sjöberg, L. Risk Perception by the Public and by Experts: A Dilemma in Risk Management / L. Sjöberg // *Human Ecology Review* Published By: Society for Human Ecology. – 1999. – Vol. 6. – N. 2. – P. 1-9.

194. Slaughter, B.V. Hydrogels in regenerative medicine / B.V. Slaughter, S.S. Khurshid, O.Z. Fisher, A. Khademhosseini, N.A. Peppas // *Advanced Materials*. – 2009. – Vol. 21. – N. 32-33. – P. 3307-3329.

195. Smidsrod, O. Alginate as immobilization matrix for cells / O. Smidsrod, G. Skjak-Braek // *Trends Biotechnol.* – 1990. – T. 8, № 3. – C. 71-78.

196. Stockwell, A.F. In vitro evaluation of alginate gel systems as sustained release drug delivery systems / A.F. Stockwell, S.S. Davis, S.E. Walker // *Journal of Controlled Release*. – 1986. – Vol. 3. – N. 1. – P. 167-175.

197. Stokes, J.R., Food Biopolymer Gels, Microgel and Nanogel Structures, Formation and Rheology. In *Food Materials Science and Engineering* / J.R. Stokes // *Food materials science and engineering*. – 2012. – P. 151-176.

198. Sugawara, S. The controlled release of prednisolone using alginate gel / S. Sugawara, T. Imai, M. Otagiri // *Pharm Res.* – 1994. – Vol. 11. – N. 2. – P. 272-277.

199. Suntornnond R. Bioprinting of Thermoresponsive Hydrogels for Next Generation Tissue Engineering: A Review / R. Suntornnond, J. An, C. K. Chua // *Macromolecular Materials and Engineering*. – 2017. – P. 1-15.

200. Svergun, D.I. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution / D.I. Svergun, M. H. J. Koch // *Rep. Prog. Phys.* – 2003. – Vol. 66. – P. 1735-1782.

201. Tadros, T.F. *Rheology of Dispersions: Principles and Applications* / T.F. Tadros. – Germany: Wiley–VCH. – 2010. – 199 p.

202. Teraoka, I. *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties* / I. Teraoka // Copyright: John Wiley & Sons, Inc. – 2002 – 360 p.

203. Thomas, A. Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor- $\alpha$  / A. Thomas, K.G. Harding, K. Moore // *Biomaterials*.

– 2000. – Vol. 21. – P. 1797-1802.

204. Thomas, M, Neural basis of alertness and cognitive performance impairments during sleepiness: I. Effects of 24 hours of sleep deprivation on waking human regional brain activity M. Thomas, H. Sing, G. Belenky, H. Holcomb, H. Mayberg, R. Dannals, H. Wagner, D. Thorne, K. Popp, L. Rowland, A. Welsh, S. Balwinski, D. Redmond // *J Sleep Res.* – 2000. – Vol. 9. – P. 335-352.

205. Turgeon, S.L. Protein + polysaccharide coacervates and complexes: from scientific background to their application as functional ingredients in food products / S.L. Turgeon, S.I. Laneuville, K. Stefan, T.N. Ian, B.U. Johan // *Modern Biopolymer Science.* – 2009. – P. 327-363.

206. Turgeon, S.L. Protein–polysaccharide complexes and coacervates / S.L. Turgeon, C. Schmitt, C. Sanchez // *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* – 2007. – Vol. 12. – N. 4-5. – P. 166-178.

207. Tytgat, L. Synergistic effect of  $\kappa$ -carrageenan and gelatin blends towards adipose tissue engineering / L. Tytgat, M. Vagenende, H. Declercq, J.C. Martins, H. Thienpont, H. Ottevaere, P. Dubruel, S. Van Vlierberghe, // *Carbohydrate Polymers.* – 2018. – Vol. 189. – P. 1-9.

208. Ulyanova, V. Barnase and binase: twins with distinct fates / V. Ulyanova, V. Vershinina, O. Ilinskaya // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278. – P. 3633-3643.

209. Vela, F.J. Effect of co-feeding HDPE on the product distribution in the hydrocracking of VGO / F.J. Vela, R. Palos, J. Bilbao, J.M. Arandes, A. Gutiérrez // *Catal. Today.* – 2020. – Vol. 353. – P. 197-203.

210. Venkatesan, J. Preparation and characterization of chitosan–carbon nanotube scaffolds for bone tissue engineering / J. Venkatesan, B. Ryu, P.N. Sudha, S.K. Kim // *International journal of biological macromolecules.* – 2012. – Vol. 50. – N. 2. – P. 393-402.

211. Voge, C. M. Wrapping and dispersion of multiwalled carbon nanotubes improves electrical conductivity of protein–nanotube composite biomaterials / C.M. Voge, J. Johns, M. Raghavan, M.D. Morris, J.P. Stegemann // *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* – 2013. – Vol. 101. – P. 231-238.

212. Voron'ko, N.G. Formation of k-carrageenan–gelatin polyelectrolyte complexes studied by <sup>1</sup>H NMR, UV spectroscopy and kinematic viscosity measurements / N.G. Voron'ko, S.R. Derkacha, M.A. Vovk, P.M. Tolstoy // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – Vol. 151. – P. 1152–1161.
213. Wang, B. Alginate-based composites for environmental applications: a critical review / B. Wang, Y. Wan, Y. Zheng, X. Lee, T. Liu, Z. Yu, J. Huang, Y.S. Ok, J. Chen, B. Gao // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. – 2019. – Vol. 49. – N. 4. – P. 318-356.
214. Wang, W. Solution Small Angle X-ray Scattering (SAXS) Studies of RecQ from *Deinococcus radiodurans* and Its Complexes with Junction DNA Substrates / W. Wang, H. Hou, Q. Du, W. Zhang, G. Liu, E.V. Shtykova, J. Xu, P. Liu, Y. Dong // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – N. 45. – P. 32414-32423.
215. Warheit, D.B. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats / D.B. Warheit, B.R. Laurence, K.L. Reed, D.H. Roach, G.A.M. Reynolds, T.R. Webb // *Toxicological Sciences*. – 2004. – Vol. 77. – P. 117-125.
216. Wei, Y. Horea Characterizing polymer structure with small-angle neutron scattering: A Tutorial / Y. Wei, M.J.A. Hore // *Journal of Applied Physics*. – 2021. – Vol. 129. – P. 171101.
217. Wells, L.A. Extended release of high pI proteins from alginate microspheres via a novel encapsulation technique / L.A. Wells, H. Sheardown // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2007. – Vol. 65. – P. 329-335.
218. Wick, P. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity / P. Wick, P. Manser, L.K. Limbach // *Toxicol. Lett.* – 2007. – Vol. 168. – N. 2. – P. 121-131.
219. Workman, J. Process Analytical Chemistry / J. Workman, M. Koch, D.J. Veltkam // *Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 75. – P. 2859-2876.
220. Wust, S. Controlled Positioning of Cells in Biomaterials – Approaches Towards 3D Tissue Printing / S. Wust, R. Muller, S. Hofmann // *Journal of Functional Biomaterials*. – 2011. – Vol. 2. – P. 119-154.

221. Xie, X.-L. Dispersion and alignment of carbon nanotubes in polymer matrix: A review / X.-L. Xie, Y.-W. Mai, X.-P. Zhou // *Materials Science and Engineering R: Reports*. – 2005. – Vol. 49. – P. 89-112.
222. Xie, Y. Synthesis and photocatalytic activity of anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles-coated carbon nanotubes / Y. Xie, Y. Xie, S. Heo, S. Yoo, G. Ali, S. Cho // *Nanoscale Res. Lett.* – 2010. – Vol. 5. – P. 603-607.
223. Xu, X.J. Mechanical properties and interfacial characteristics of carbon-nanotube-reinforced epoxy thin films / X.J. Xu, M.M. Thwe, C. Shearwood, K. Liao // *Applied Physics Letters*. – 2002. – Vol. 81. – P. 2833-2835.
224. Xuan, W. Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling / W. Xuan, T. Beeckman, G. Xu // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2017. – Vol. 39. – P. 57-65.
225. Yang, F. Synthesis, characterization and applied properties of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer / F. Yang, G. Li, Y.G. He, F.X. Ren, G.X. Wang // *Carbohydrate Polymer*. – 2009. – Vol. 78. – P. 95-99.
226. Yang, H. A common antimicrobial additive increases colonic inflammation and colitis-associated colon tumorigenesis in mice / H. Yang, W. Wang, K.A. Romano, M. Gu, K.Z. Sanidad, D. Kim, G. Zhang // *Science Translational Medicine*. – 2018. – Vol. 10. N. 443. – P. 4116.
227. Yang, J. Fabrication and Characterization of Soluble Multi-Walled Carbon Nanotubes Reinforced P(MMA-co-EMA) Composites / J. Yang, J. Hu, C. Wang, Y. Qin, Z. Guo // *Macromolecular Materials and Engineering*. – 2004. – Vol. 289. – P. 828-832.
228. Yuan, X. Cellular Toxicity and Immunological Effects of Carbon-based Nanomaterials / X. Yuan, X. Zhang, L. Sun, Y. Wei, X. Wei // *Part Fiber Toxicology*. – 2019. – Vol. 16. – P. 1-27.
229. Yuguchi, Y. Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence / Y. Yuguchi, T.T. Thu Thuy, H. Urakawa, K. Kajiwara // *Food Hydrocolloids*. – 2002. – Vol. 16. – N. 6. – P. 515-522.
230. Zarzyka, I. Influence of Crosslinker and Ionic Comonomer Concentration on Glass Transition and Demixing/Mixing Transition of Copolymers Poly (N-

Isopropylacrylamide) and Poly (Sodium Acrylate) Hydrogels / I. Zarzyka, M. Pyda, M.L. Di Lorenzo // *Colloid Polym. Sci.* – 2014. – Vol. 292. – P. 485-492.

231. Zerpa, A. Hardwood Kraft Lignin-Based Hydrogels: Production and Performance / A. Zerpa, L. Pakzad, P. Fatehi // *ACS Omega.* – 2018. – Vol. 3. – N. 7 – P. 8233-8242.

232. Zhang, X.L. Alginate microsphere filled with carbon nanotube as drug carrier / X.L. Zhang, Z.Y. Hui, D.X. Wan, H.T. Huang, J. Huang, H. Yuan, J.H. Yu. // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2010. – Vol. 47. – P. 389-395.

233. Zhao, F. Composites of Polymer Hydrogels and Nanoparticulate Systems for Biomedical and Pharmaceutical Applications / F. Zhao, D. Yao, R. Guo, L. Deng, A. Dong, J. Zhang // *Nanomaterials.* – 2015. – Vol. 5. – N. 4. – P. 2054-2130.

234. Zhuang, C. Anti-degradation gelatinfilms crosslinked by active ester based on cellulose / C. Zhuang, F. Tao, Y. Cui // *RSC Adv.* – 2015. – Vol. 5. – P. 52183-52193.

235. Zyoud, A. Optimizing photo-mineralization of aqueous methyl orange by nano-ZnO catalyst under simulated natural conditions / A. Zyoud, A. Zu'bi, M.H.S. Helal, D. Park, G. Campet, H.S. Hilal // *Journal of Environmental Health Science and Engineering.* – 2015. – Vol. 13. – N 1. – P. 1-46.