



# МИР материалов и технологий

Гибридные  
наноформы биоактивных  
и лекарственных веществ

Под редакцией М.Я. Мельникова,  
Л.И. Трахтенберга

ТЕХНОСФЕРА  
Москва  
2020

**УДК 544.4**  
**ББК 24.5**  
**Г46**

*Рецензент: Д.С. Бугаев, д.ф.-м.н., академик РАН, профессор,  
зав. кафедрой вакуумной электроники МФТИ*

**Г46 Гибридные наноформы биоактивных и лекарственных веществ**  
**Под ред. М.Я. Мельникова, Л.И. Трахтенберга**  
**М.: ТЕХНОСФЕРА, 2020. – 408 с. ISBN 978-5-94836-596-1**

В учебном пособии, состоящем из Введения и 11 глав, обобщены результаты исследований, посвященных различным аспектам биоактивных и лекарственных нанокompозитных систем. Большое внимание уделено особенностям синтеза и тому новому, что дает наноразмер объектов в протекании в них различных физико-химических процессов. Кроме того, сделана попытка систематизировать методы синтеза, приводящие к получению соединений различного класса. Подчеркивается, что эффективность лекарственных веществ и их фармакологические свойства во многом зависят от кристаллической структуры, в частности от присутствия тех или иных полиморфных модификаций или аморфного состояния. Первоочередное значение имеет размер наночастиц, так как малым частицам проще преодолевать защитные барьеры организма человека и животных, проникать в клетки и накапливаться в тканях.

Все главы написаны группами научных сотрудников, активно работающих в разных областях нанобиомедицины. Наряду с обзорным материалом, излагаются и оригинальные исследования авторов, обобщающие их работы нескольких последних лет. Предлагаемая книга будет полезным учебным и учебно-научным пособием для читателей широкого круга интересов от студентов и аспирантов до преподавателей и научных сотрудников, интересующихся различными аспектами теории и практики наноразмерных биоактивных и лекарственных веществ.

**УДК 544.4**  
**ББК 24.5**

© Мельников М.Я., Трахтенберг Л.И., 2020  
© АО «РИЦ «ТЕХНОСФЕРА», оригинал-макет, оформление, 2020

**ISBN 978-5-94836-596-1**

# Содержание

<b>Введение</b>	
<i>Мельников М.Я., Трахтенберг Л.И.</i> .....	8
<b>Список аббревиатур с расшифровкой</b> .....	17
<b>Глава 1</b>	
<b>Криохимический синтез нанопорошков лекарственных веществ.</b>	
<i>Шабатин В.П., Морозов Ю.Н., Верная О.И., Шабатина Т.И.</i> .....	20
1.1. Карведилол .....	25
1.2. 5-Андростендиол-3 $\beta$ ,17 $\beta$ .....	28
1.3. Феназепам .....	29
1.4. Пироксикам .....	34
1.5. Дегидроэпиандростерон (ДГЕА) .....	35
1.6. Диоксидин .....	39
1.7. Гентамицина сульфат .....	46
Заключение .....	48
Авторы .....	49
Литература.....	50
<b>Глава 2</b>	
<b>Наноконпозиты антибиотик-биологически активный металл.</b>	
<i>Верная О.И., Шабатина Т.И., Шабатин В.П., Семенов А.М., Мельников М.Я.</i> .....	54
2.1. Криохимический синтез гибридных наноконпозитов Ag (Cu)/диоксидин и Ag (Cu)/гентамицина сульфат.....	56
2.2. Структурная и спектроскопическая характеристика образцов .	57
2.3. Определение антибактериальной активности образцов .....	63
Заключение .....	64
Авторы .....	65
Литература.....	66

**Глава 3****Принципы и методы криоструктурирования полимерных систем для создания инновационных материалов биомедицинского назначения.**

<i>Лозинский В.И.</i> .....	69
3.1. Криогели и криоструктураты — что это такое, в чем сходство и каковы различия.....	70
3.2. Химически-спитые полимерные криогели и криоструктураты	73
3.3. Нековалентные (физические) полимерные криогели и криоструктураты .....	81
3.4. Ионно- и координационно-спитые полимерные криогели и криоструктураты .....	87
Заключение .....	91
Авторы .....	92
Литература.....	92

**Глава 4****Экспериментальные подходы к получению белковых криогелей и криоструктуратов.**

<i>Родионов И.А., Слинцкая Е.С., Иванов Р.В., Цицкарашвили А.В., Лозинский В.И.</i> .....	102
4.1. Криогели и криоструктураты на основе фибриллярных белков	105
4.2. Криогели и криоструктураты на основе глобулярных белков ..	112
4.3. Криогели и криоструктураты на основе белков с неупорядоченной конформацией статистического клубка.....	120
Заключение .....	127
Авторы .....	128
Литература.....	129

**Глава 5****Гибридные наноформы антибактериальных веществ в биополимерных матрицах.**

<i>Шабатина Т.И., Верная О.И., Нурждина А.В., Шабатин В.П., Семенов А.М., Лозинский В.И., Мельников М.Я.</i> .....	137
5.1. Синтез гибридных наноформ .....	143
5.2. Структурная и спектральная характеристика криоформируемых гибридных наносистем.....	145
5.3. Антибактериальная активность гибридных наноформ и кинетика высвобождения лекарственных компонентов из биополимерных матриц .....	151

Заключение .....	155
Авторы .....	156
Литература.....	157

## Глава 6

### Биокатализаторы в криоструктурированных полимерных матрицах.

<i>Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Лозинский В.И.</i> .....	161
6.1. Полимерные криогели и криоструктураты в качестве носителей иммобилизованных молекул и клеток .....	163
6.2. Иммобилизация ферментных биокатализаторов на криогенно-структурированных носителях.....	173
6.3. Биокатализаторы на основе разных клеток микроорганизмов, включенных в криогенно-структурированные носители: бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы, искусственные и природные ассоциации разных клеток (анаэробный ил) .....	183
Заключение .....	197
Авторы .....	198
Литература.....	199

## Глава 7

### Низкотемпературные методы получения нано- и биоматериалов.

<i>Шляхтин О.А., Лозинский В.И.</i> .....	212
7.1. Синтез наноматериалов из замороженных растворов .....	213
7.2. Криотропное гелеобразование в золях неорганических веществ	217
7.3. Сублимационная сушка продуктов гидролиза, осаждения и со-осаждения .....	218
7.4. Низкотемпературные методы изоляции наночастиц .....	224
7.5. Низкотемпературные методы в синтезе углеродных наноматериалов .....	227
Заключение .....	231
Авторы .....	233
Литература.....	233

**Глава 8****Наночастицы серебра: синтез, биологическое действие на бактерии и высшие растения.**

<i>Кудринский А.А., Кондаков С.Э., Крутяков Ю.А.</i> .....	246
8.1. Химический синтез сферических НЧ серебра.....	247
8.2. Физические методы синтеза сферических наночастиц серебра .....	257
8.3. Методы синтеза несферических наночастиц серебра .....	260
8.4. Антибактериальная активность наночастиц серебра .....	264
8.5. Биологическая активность серебра в отношении высших растений .....	268
Заключение .....	286
Авторы .....	287
Литература.....	287

**Глава 9****Наноразмерные системы для контролируемой доставки лекарственных веществ.**

<i>Бычкова А.В., Ольхов А.А., Карпова С.Г., Иорданский А.Л.</i> .....	304
9.1. Области применения биоразлагаемых форм доставки соединенных терапевтического назначения .....	306
9.2. Основные компоненты биоразлагаемых инновационных форм доставки ЛВ .....	312
9.3. Структура и морфология ультратонких волокон как носителей ЛВ .....	317
Заключение .....	334
Благодарности .....	335
Авторы .....	335
Литература.....	336

**Глава 10****Металл-полимерные нанокомпозиты: криохимический синтез, структура и эксплуатационные свойства.**

<i>Герасимов Г.Н., Громов В.Ф., Иким М.И., Трахтенберг Л.И.</i> .....	342
10.1. Методы твердофазного криохимического синтеза .....	344
10.2. Структура металл-полимеров, полученных криохимическим методом .....	347
10.3. Физико-химические свойства металл-полимерных материалов.	358
Проводимость и фотопроводимость .....	359
Ферромагнитные свойства. Запись и считывание информации ....	364

Диэлектрические свойства .....	366
Каталитическая активность .....	368
10.4. Применение металл-полимеров в биологии и медицине .....	372
Заключение .....	376
Авторы .....	378
Литература.....	378

## Глава 11

### Магнитные наночастицы в медицине.

<i>Верная О.И., Шабатин В.П., Шабатина Т.И., Мельников М.Я.....</i>	385
11.1. Токсичность наночастиц магнетита и маггемита.....	387
11.2. Синтез магнитных наночастиц оксидов железа .....	389
11.3. Биомедицинское применение магнитных оксидов железа .....	392
Заключение .....	403
Авторы .....	403
Литература.....	404

*Съешь осиновой коры —  
И взбодрись до поры:  
Чай, не химия какая,  
Чай, природные дары!*

Л.А. Филатов. Про Федота-стрельца. . .

## Введение

*Мельников М.Я.<sup>1</sup>, Трахтенберг Л.И.<sup>1,2</sup>*

В связи с весьма сложной экологической обстановкой, стрессовыми ситуациями, непростыми производственными отношениями и др. даже относительно молодым людям приходится все чаще обращаться за медицинской помощью. Помимо обычных советов: не курить, воздерживаться от спиртного, делать утреннюю зарядку, несколько раз в неделю посещать бассейн и тренировочный зал, а также есть овощи и фрукты, пациентам, как правило, прописывают различные биоактивные и лекарственные препараты. Как известно, количество таких веществ в настоящее время исчисляется многими тысячами. Существует множество способов приготовления и применения этих препаратов и над этими задачами работают научные лаборатории во всех развитых странах. Вместе с тем возникают новые вызовы, например появление большого числа штаммов патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам. При этом скорость появления таких штаммов опережает возможности синтетической химии в создании новых лекарственных субстанций и требует поиска новых подходов к борьбе с ними, в частности разработки нанокompозитных составов с новыми функциональными свойствами.

В предлагаемом учебном пособии основным объектом изучения будут наночастицы — ультрадисперсные объекты, объединяющие атомы химических элементов или молекулы органических и неорганических соединений с размерами в несколько нанометров (нм; 1 нм =  $10^{-9}$  метров). Наночастицы существуют в природе и также являются результатом деятельности человека. Из-за своего субмикроскопического размера они обладают уникальными характеристиками, в первую очередь, огромной площадью поверхности на единицу объема, высокой долей атомов в поверхностных и приповерхностных слоях и способностью проявлять квантовые эффекты. Их уникальные свойства невозможно прогнозировать только исходя

---

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН



из свойств массивных материалов. Они находят практическое применение в различных областях, включая медицину, инженерию, катализ и экологию.

В 2008 году Международная организация по стандартизации (ISO) определила наночастицу как дискретный нанообъект, где все три декартовых измерения меньше 100 нм. Стандарт ISO аналогичным образом определил двумерные нанообъекты (нанодиски и нанопластины) и одномерные нанообъекты (нановолокна и нанотрубки). Но в 2011 году Комиссия Европейского Союза одобрила более широкое определение наночастицы: природный или рукотворный материал, содержащий частицы в несвязанном состоянии или в виде агломерата, размер 50 и более % которых хотя бы в одном из декартовых измерений находится в диапазоне 1 нм–100 нм [1].

Вопросы, которые рассматриваются в данном пособии, касаются научных проблем, связанных с разнообразными методами создания наноконъюгатных лекарственных форм, а также их функциональными свойствами. Рассматриваются разные объекты с различной химией протекающих процессов. Основное внимание уделено различным аспектам криохимического синтеза, обладающего такими преимуществами, как чистота получаемых материалов, их строгое соответствие составам исходных веществ, возможность регулирования размеров наночастиц, а также однородность распределения компонентов в конечном продукте. Вместе с тем следует признать, что в настоящее время сведения о промышленном изготовлении наноформ биоактивных и лекарственных веществ криохимическим методом весьма ограничены. Поэтому обсуждаются различные процессы получения этих веществ также и в широком диапазоне температур.

Наряду с проблемами синтеза и применения биологических препаратов важное значение имеют также их доставка и сегрегация. Помимо естественной доставки, определяемой кровотоком и диффузией в организме, в научной литературе рассматривается и принудительная доставка, под действием низкочастотного электромагнитного и электрического полей, благодаря электрофоретическому или диэлектрофоретическому эффектам. В основе метода лекарственного электрофореза лежит миграция ионов, содержащихся в лекарствах, в электрическом поле к противоположно заряженному электроду при введении лекарственных веществ в организм через кожу или слизистую оболочку. В случае диэлектрофореза лекарственные частицы подвергаются действию неоднородного электрического поля и движутся силой, обусловленной градиентом напряженности поля, в сторону его усиления. Благодаря значительным различиям в диэлектрических свойствах биологических объектов, диэлектрофорез уже в течение нескольких десятилетий активно используется в медицине и биологических исследованиях для транспортировки и сортировки различных видов

клеток, например отделения раковых клеток от здоровых, выделения из крови отдельных видов кровяных телец и т. д.

Направленный поток наночастиц возможен также в отсутствие стационарных внешних воздействий за счет сил с нулевым средним значением. Такой поток можно организовать с использованием рэтчет- или моторного эффекта, который возникает в системах с нарушенной зеркальной симметрией как результат выпрямления неравновесных флуктуаций различной природы. Изучение рэтчет-моделей дало ключ к пониманию ряда биологических процессов, таких как, например, функционирование внутриклеточных трансляционных белковых машин, выполняющих транспортные задачи, а также вдохновило на разработки наномеханизмов, работающих внутри биологических систем. Такие «диэлектрофоретические рэтчеты» имеют ряд преимуществ, к которым относится большое количество параметров управления движением, в том числе температура, частота и форма импульсов приложенного поля, вязкость среды и т. п.

Свойства лекарственных веществ могут быть улучшены (без изменения их химического состава) различными способами: варьированием размера частиц, структуры, формированием сольватов, молекулярных комплексов, сокристаллов и др. Эффективность лекарственных веществ и их фармакологические свойства во многом зависят от кристаллической структуры, в частности от присутствия тех или иных полиморфных модификаций или аморфного состояния. Первоочередное значение имеет размер наночастиц, так как малым частицам проще преодолевать защитные барьеры организма, проникать в клетки и накапливаться в тканях. Таким образом, одна и та же эффективность биоактивных и лекарственных веществ может быть получена при разных количествах препаратов, что позволяет снизить, а иногда и избавиться от побочных эффектов.

Среди многочисленных работ, посвященных биоактивным и лекарственным композициям, в данном пособии преимущественно рассматриваются только те исследования, которые относятся к наноразмерным системам. Т. е. будут подчеркиваться особенности синтеза и то новое, что дает наноразмер объектов в протекании в них различных физико-химических процессов. При этом будет сделана попытка систематизировать методы синтеза, приводящие к получению соединений различного класса.

Рассмотрение начинается с обсуждения особенностей применения низких температур для получения новых наноразмерных модификаций лекарственных соединений различных классов. В **главе 1** представлены преимущества и недостатки различных вариантов криохимического синтеза и криохимической модификации. На ряде примеров показана возможность микронизации (уменьшение размера частиц) лекарственных субстанций

и формирования новых метастабильных кристаллических структур, полиморфных модификаций, различающихся как молекулярной конформацией лекарственных веществ, так и системой межмолекулярных водородных связей, стабилизирующих молекулярные упаковки в различных кристаллических структурах. Проанализированы эффекты, связанные с уменьшением размера частиц исходной субстанции и возможности получения новых полиморфных кристаллических модификаций, а также имеющиеся положительные результаты биологического тестирования.

Следует отметить, что широкое и зачастую необоснованное применение антибиотиков в медицине и ветеринарии привело к возникновению большого числа штаммов патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам. Антибиотико-резистентные микроорганизмы являются одной из основных проблем современной медицины. В **главе 2** предлагается одно из возможных решений данной проблемы, заключающееся в создании новых лекарственных форм, содержащих помимо антибактериальных препаратов наночастицы биологически активных металлов (Ag, Cu), которые активны в отношении патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам. Такие формы обладают более высокой антибактериальной активностью по сравнению с исходными наночастицами металлов и антибактериальными препаратами и требуют меньшего времени на клинические и доклинические испытания по сравнению с новыми антибиотиками, так как входящие в их состав компоненты уже содержатся в применяющихся в настоящее время лекарственных формах.

Криоструктурирование полимерных систем — это процессы, включающие замораживание исходно макроскопически бесструктурного раствора или коллоидной дисперсии соответствующих предшественников, что после инкубации в замороженном состоянии и дальнейшем оттаивании или удалении кристаллической фазы сублимацией либо криоэкстракцией приводит к получению пространственно-структурированного полимерного материала, обладающего макропористой морфологией. **Глава 3** посвящена описанию процессов криоструктурирования и обсуждению свойств образующихся полимерных матриц. Отмечается, что в результате криогенной обработки исходных растворов мономерных или полимерных предшественников можно сформировать макропористые полимерные материалы двух основных типов: *криогели* (когда в замороженной среде происходит образование узлов трехмерной полимерной сетки) и *криоструктураты* (когда спитая сетка не образуется, а закристаллизованный растворитель тем или иным методом удаляется из замороженного препарата).

Криотропное гелеобразование протекает в незамерзшей жидкой микрофазе макроскопически замороженных образцов, а также может происходить в замороженных как водных, так и органических средах, при

условии, что используемый растворитель и режимы охлаждения системы обеспечивают ее кристаллизацию. Криогели и криоструктураты обладают специфической макропористой текстурой, причем крупные поры взаимосвязаны. Роль порога при формировании и криогелей, и криоструктуратов выполняют кристаллы замерзшего растворителя, поэтому характер пористости получаемого полимерного материала определяется режимами кристаллизации и иногда рекристаллизации. Полимерные криогели и криоструктураты, особенно их представители, сформированные на основе нетоксичных и разрешенных к медицинскому применению биополимеров, — перспективные материалы для биомедицинских областей науки и практики.

Направление, связанное с *криогелями* и *криоструктуратами*, продолжает рассматриваться в **главе 4**. Отдельный научный и прикладной интерес представляют криогели и криоструктураты на основе белковых веществ, поскольку в большинстве случаев белковые материалы биосовместимы, нетоксичны и биodeградируемы. В частности, такие материалы с помощью приемов криоструктурирования могут быть сформированы на основе белков разных типов — фибриллярных, глобулярных, белков с неупорядоченной клубковой конформацией полипептидных цепей. При этом на комплекс физико-химических свойств получаемых криогенно-структурированных матриц и их макропористую морфологию влияет множество факторов, к основным из которых относятся тип белка, его концентрация в исходном растворе, концентрация сшивающих агентов (если таковые применяются), присутствие и количество растворимых или дисперсных добавок, а также режимы криогенного воздействия. В результате удается получать инновационные практически значимые материалы биомедицинского назначения, обладающие необходимым, зачастую уникальным, набором свойств.

В **главе 5** обсуждаются криохимические подходы, развитые для синтеза гибридных наносистем, представляющих собой сульфат гентамицина или криомодифицированную  $\beta$ -форму диоксидина, содержащие наночастицы серебра или меди. Полученные гибридные композиты и их прекурсоры были включены в криогенно-структурированные биополимерные носители на основе желатина, БСА, альгината кальция и хитозана. Гибридные композиты на основе металлов и антибактериальных препаратов, включенные в альгинатные, желатиновые и БСА матрицы проявляют большую активность к подавлению роста *E. coli* 52 и *S. aureus* 144, чем их составляющие по отдельности. Исключением являются системы, включенные в хитозановые криоструктураты. Представляется возможным, что гибридные системы Ag/антибактериальный препарат и Cu/антибактериальный компонент более сильно взаимодействуют с хитозановой матрицей,

чем их отдельные компоненты, что приводит к снижению их антибактериальной активности.

В **главе 6** рассматриваются биокатализаторы, иммобилизованные на/в криогенно-структурированных полимерных матрицах. Как известно, криогенно-структурированные носители представляют широкие возможности для создания биокаталитических систем на основе различных ферментов. Иммобилизация существенно увеличивает их стабильность, а ферменты позволяют использовать биокатализаторы в мягких условиях и заметно усиливают их каталитическую эффективность по сравнению с классическими катализаторами. К преимуществам добавляются плюсы, приносимые криоструктурированными носителями: отсутствие ограничений для массообмена, возможность использования высоких скоростей протока, простота получения и масштабируемость. На основе криоструктурированных носителей созданы биопрепараты для доставки лекарств, а также ферментов, и для их контролируемого медленного высвобождения. Еще одним направлением применения криоструктурированных матриц является протеомный анализ клеток с применением пористых подложек и создание мультиферментных систем.

**Глава 7** посвящена использованию низких температур при получении нано- и биоматериалов из водных растворов, суспензий и осадков. Низкотемпературные методы могут использоваться при синтезе наночастиц для последующего использования в качестве сорбентов-носителей иммобилизованных клеток микроорганизмов и лекарственных препаратов. Высокая скорость замораживания многокомпонентного водного раствора обеспечивает высокую химическую однородность продукта сушки, что приводит к снижению температуры фазообразования оксидных соединений и уменьшению размера их частиц. Низкотемпературный золь-гель переход в растворах полимеров при замораживании обеспечивает формирование прочного пористого полимерного каркаса. Пиролиз подобных каркасов в инертной среде приводит к формированию объемных углеродных наноматериалов с высокими значениями удельной поверхности.

Важной особенностью криохимических методов является возможность регулирования размеров макропор в объемных наноструктурированных материалах путем управления размерами кристаллитов льда при замораживании. Использование сублимационной сушки осадков позволяет предотвратить образование прочных агломератов наночастиц, образующихся при атмосферной сушке. Сублимационная сушка суспензий является одним из основных методов выделения индивидуальных неорганических и углеродных наночастиц из жидкой фазы для последующего исследования. Описаны также основные сферы применения различных видов синтезируемых материалов.

Особенности синтеза водорастворимых наночастиц серебра обсуждаются в **главе 8**. Благодаря заметной антибактериальной активности наночастиц серебра они широко используются для создания бактерицидных покрытий и лекарств, а высокая гидрофильность способствует практическому применению этих наночастиц в области аналитической химии, биологии и медицины. Препараты, приготовленные на основе наносеребра, обладают высокой биологической активностью в отношении высших растений, что связано с действием ионов серебра, высвобождающихся при окислительном растворении наночастиц. Следует иметь в виду, что фитотоксичность серебра препятствует широкому использованию серебросодержащих препаратов в качестве регуляторов роста и развития растений, что может быть преодолено в результате использования коллоидного раствора химически модифицированных наночастиц серебра.

Применение биоразлагаемых форм лекарственных веществ в различных областях биомедицины, в том числе при реконструкции костной и хрящевой ткани, при создании кардио-, урологических и неврологических имплантатов, при разработке систем для противовоспалительной и противоопухолевой терапии, при тромболитической терапии и в целях остановки кровотечений рассматривается в **главе 9**. Одновременное использование природных и синтетических макромолекул создает уникальные возможности для доставки различных низко- и высокомолекулярных лекарственных веществ и обеспечения необходимых кинетических профилей их высвобождения.

Развитие технологии формирования нановолокон в электростатическом поле позволяет создавать разнообразные по форме и морфологии материалы с высокой удельной поверхностью и пористостью, с адекватными механическими свойствами, широким диапазоном структурно-динамических и диффузионных характеристик, способностью эффективно контролировать доставку лекарственных веществ. В главе сделан акцент на гибридные микро- и наночастицы, а также композиционные ультратонкие волокна, обладающие высокой удельной поверхностью, и рассмотрены специфические свойства нановолокнистых биоразлагаемых носителей, что принципиально важно при создании нового поколения терапевтических систем для дозированного и направленного транспорта лекарственных веществ в живых системах.

Рассмотрению структуры и свойствам металлполимерных нанокомпозигов, полученных методом совместной конденсации паров металла и мономера и последующей твердофазной низкотемпературной полимеризацией образующихся соконденсатов, посвящена заключительная **Глава 10**. Основным преимуществом этого метода по сравнению с другими является возможность стабилизации металлических наночастиц без каких-либо специфических координационных связей между поверхностью частицы

и полимером или без добавок каких-либо стабилизирующих соединений. В обзоре обсуждается механизм криохимического твердофазного синтеза металлсодержащих полимеров и рассмотрены электрофизические, диэлектрические, сенсорные, каталитические и ферромагнитные свойства образующихся композитов.

Особое внимание уделено использованию таких материалов в различных областях биологии и медицины. Рассматриваются металлополимерные нанокомпозиты, отличающиеся высокой эффективностью антибактериального действия при отсутствии побочных отрицательных эффектов, характерных для других бактерицидных препаратов. Такие нанокомпозитные пленки служат защитой от патогенных бактерий. Обсуждаются разработанные на основе наноструктурированных металлополимерных пленок новые высокочувствительные спектральные методы выявления и анализа биомолекул. Применение этих методов в медицинской практике позволяет обнаружить в организме источники различных заболеваний.

**Глава 11** посвящена рассмотрению характеристик магнитных наночастиц, которые наряду со спектром свойств, присущих наноматериалам, в первую очередь большой удельной поверхности и высокой доли поверхностных атомов, обладают также суперпарамагнитными свойствами. Наночастицы могут переходить в однодоменное состояние, т. е. при отсутствии внешнего магнитного поля средняя намагниченность вещества равна нулю, а во внешнем магнитном поле вещество ведет себя как парамагнетик, но с магнитной восприимчивостью заметно более высокой, чем у обычных парамагнетиков. В результате материал на основе магнитных наночастиц становится важным классом биомедицинских функциональных наноматериалов. В первую очередь, это применительно к оксидам железа магнетита и маггемита, для которых исследования *in vitro* и *in vivo* показали низкую токсичность и высокую биосовместимость в сравнении с другими магнитными наноматериалами. Благодаря своим исключительным биологическим, физическим и химическим свойствам они находят широкое применение в таких областях, как гипертермия, направленная доставка лекарственных веществ, тканевая инженерия, магнитная сепарация биологических объектов (клеток, бактерий, вирусов, ДНК) и диагностика (они используются в качестве агентов для МРТ и при проведении иммуноанализа). В главе, помимо обсуждения основных проблем и перспектив использования наночастиц магнитных оксидов железа для передовых биомедицинских применений, также отражена информация об их структуре, методах получения и свойствах.

Каждая из представленных глав является самодостаточной и может быть изучена независимо от других. Наряду с обзорным материалом все главы содержат оригинальные исследования авторов, обобщающие их ра-

боты нескольких последних лет. Нетрудно видеть, что в учебное пособие включены разделы, охватывающие различные аспекты синтеза и использования наночастиц биоактивных и лекарственных веществ. Это сделано намеренно, т. к. такой состав содержания, как мы полагаем, будет способствовать ознакомлению исследователей, работающих в близких междисциплинарных областях, с новейшими достижениями в создании и изучении свойств гибридных наночастиц лекарственных веществ, а возможно, приведет и к их консолидации. Работы, по результатам которых написано учебное пособие, проводились при поддержке ряда научных грантов, в частности, грантов РФФИ № 16-13-10365 и РФФИ 16-08-00900а, 15-08-05178а, 17-07-00131а, 19-07-00141а, 20-07-00158а, 18-57-00003\_Бел\_а, 18-29-02012\_мк.



# Список аббревиатур с расшифровкой

- АВТС — 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)
- АГЭ — аллилглицидиловый эфир
- АОТ — бис(2-этилгексил)сульфосукцинат натрия
- АФК — активные формы кислорода
- БАВ — биологически активное вещество
- БСА — бычий сывороточный альбумин
- ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГБК — гетерогенный биокатализатор
- ГКР — гигантское комбинационное рассеяние
- ДГЕА — дегидроэпиандростерон
- ДМСО — диметилсульфоксид
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДПД — дипиридамо́л
- ДСК — дифференциальная сканирующая калориметрия
- ЗЗР — зона задержки роста
- ИБК — иммобилизованный биокатализатор
- ИК-спектроскопия — инфракрасная спектроскопия
- ККГ — критическая концентрация гелеобразования
- КМЦ — карбоксиметил целлюлоза
- КР — комбинационное рассеяние
- КС — криоструктуры
- ЛВ — лекарственное(ые) вещество(а)
- МУНТ — мультистенные углеродные нанотрубки
- НД — нормативный документ
- НЖМФ — незамерзшая жидкая микрофаза
- ПАВ — поверхностно активное вещество
- ПВП — поливинил-2-пирролидон
- ПВС — поливиниловый спирт
- ПГБ — полигидроксibuтират, поли-(3-гидроксibuтират), *поли-β-гидроксibuтират*
- ПГМБ — гидрохлорид полигексаметиленбигуанида
- ПЭГ — полиэтиленгликоль
- ПЭГДА — полиэтиленгликоль диакрилат
- ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия

- РНК — рибонуклеиновая кислота  
РФА — рентгенофазовый анализ  
со-ПАА-АГЭ — сополимер полиакриламида и аллилглицидилового эфира  
со-ПАА-БАА — сополимер полиакриламида и N, N'-бисакриламида  
со-ПГЭМА-ГМА — сополимер поли-2-гидроксиэтилметакрилата и глицидилметакрилата  
со-ПГЭМА-ПЭГДА — сополимер поли-2-гидроксиэтилметакрилата и полиэтиленгликоль диакрилата  
со-ПГМА-МАТ — сополимер полиглицидилметакрилата и N-метакрилоил-L-триптофана  
со-ПММА-ГМА — сополимер полиметилметакрилата и глицидилметакрилата  
со-ПЭГМА-ТЭГДА — сополимер поли(этиленгликоль) метакрилата и тетраэтиленгликоль диакрилата  
СЭМ — сканирующая электронная микроскопия  
ТГЗ — транслугтаминаза  
ТГ — термобариметрия  
ТЕМПО — (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил  
ТКФ — трикальциевый фосфат,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$   
ТСХ — тонкослойная хроматография  
ТФП — тетрафенилпорфирин  
ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия  
УФ-спектроскопия — ультрафиолетовая спектроскопия  
УНТ — углеродные нанотрубки  
ФС — фармакопейная статья  
ЧДА — чистый для анализа  
ЦТМА — цетилтриметиламмоний  
ЭДК — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиймид  
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота,  $(\text{HOOCCH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$   
ЭФ — электроформование  
ЯМР — ядерный магнитный резонанс  
CVD — chemical vapor deposition; метод получения пленок пиролизом паров металлоорганических соединений  
OPF — олиго (полиэтиленгликоль фумарат)  
PCL — поликапролактон  
PEG — полиэтиленгликоль  
PGA — полигликолевая кислота

PLA — полимолочная кислота

PLGA — сополимер полилактид-ко-гликолид

PMMA — полиметилметакрилат

PPF — полипропиленфумарат

PPX — поли-пара-ксилилен

PX — пара-ксилилен

SAXS — small-angle X-ray scattering (малоугловое рассеяние рентгеновских лучей)

tPA — тканевой активатор плазминогена

Triton X-100 — [п-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилполи(оксиэтилен)]<sub>n</sub>

WAXS — wide-angle X-ray diffraction (рентгеновское рассеяние в больших углах)

α-FP — α-фетопротеин

# Глава I

## Криохимический синтез нанопорошков лекарственных веществ

*Шабаткин В.П.<sup>1</sup>, Морозов Ю.Н.<sup>1</sup>, Верная О.И.<sup>1</sup>, Шабаткина Т.И.<sup>1</sup>*

Путь от синтеза биологически активной молекулы к внедрению лекарственного препарата часто занимает десятилетия. Основные затраты времени и ресурсов приходятся на доклинические и клинические испытания, в том числе проверку токсичности, подбор оптимальной и предельной доз, а также отработку производственной технологии, выбор наиболее приемлемой формы. Очень важна всесторонняя проверка безопасности новых лекарств, изучение побочных эффектов их применения, многие из которых проявляются лишь через много лет, иногда даже в следующих поколениях. В этом отношении известные, проверенные десятилетиями, а иногда и веками, лекарственные вещества обладают рядом преимуществ, в частности не требуют длительных фармакологических и токсикологических испытаний, хотя их эффективность не всегда так высока, как хотелось бы. Поэтому актуальна задача разработки на их основе более действенных форм, что позволяет быстрее окупить вложенные в исследования средства чем поиск абсолютно новых препаратов.

Существует много способов улучшения свойств лекарственных веществ (без изменения их химического состава): варьирование размера частиц, структуры, формирование сольватов, молекулярных комплексов, со-кристаллов и др. [1–3]. Биофармакологические свойства и эффективность лекарственных веществ зависят от их кристаллической структуры, в частности от присутствия тех или иных полиморфных модификаций или аморфного состояния [3, 4].

Размер имеет первоочередное значение, так как малые частицы, размером менее 200 нм, легче преодолевают защитные барьеры организма человека и животных, проникают в клетки и накапливаются в тканях, чем более крупные частицы [4]. Классический пример — даназол, плохо растворимый в воде ингибитор гонадотропина. Абсолютная биодоступность микросуспензии даназола у собак (200 мг, 10 мкм) составляет 52%, в то время как при введении наносуспензии (200 мг, 169 нм) она достигает 82,3%.

---

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет

Таким образом, одна и та же эффективность может быть получена при уменьшении дозы лекарства, что позволяет снизить побочные эффекты [5].

Значительная доля лекарственных веществ, используемых в настоящее время в медицинской практике, плохо растворимы в воде и других биологических жидкостях. Плохая растворимость лекарственных веществ приводит к ряду проблем, связанных с их применением. Из-за низкой растворимости в раствор для инъекций приходится вводить органические со- растворители и стабилизаторы, что приводит к нежелательным побочным эффектам [6]. Например, Cremophor<sup>®</sup> EL используется как солюбилизатор для паклитакселя в препарате Таксол и обладает серьезными побочными эффектами, такими как нефро- и нейротоксичность [7]. В результате исследования, летальная доза (LD50) наносuspензии паклитакселя составляет 100 мг/кг, что значительно выше, чем 30 мг/кг для препарата Таксол [8].

Уменьшение размеров частиц лекарственных соединений приводит к росту их удельной поверхности и, соответственно, скорости растворения, и в некоторых случаях к росту экспериментально определяемой растворимости насыщения и образованию стабильных пересыщенных растворов. Для плохо растворимых лекарственных веществ используются также суспензии нанокристаллов, которые, как и растворы, можно вводить в организм человека через инъекции. В настоящее время на фармацевтическом рынке уже имеется целый ряд лекарственных препаратов, содержащих действующее вещество в наноформе: Rapamune<sup>®</sup> (Sirolimus), Emend<sup>®</sup> (Aprepitant), Tricor<sup>®</sup> (Fenofibrate), Megace ES<sup>®</sup> (Megestrol acetate), Avinza<sup>®</sup> (Morphine sulfate), Focalin<sup>®</sup> XR (Dexmethyl-phenidate HCl), Ritalin<sup>®</sup> LA (Methylphenidate HCl), Zanaflex Capsules<sup>™</sup> (Tizanidine HCl), Triglide<sup>®</sup> (Fenofibrate).

Для получения наночастиц лекарственных препаратов используют методы, основанные на двух принципиально различных подходах: «сверху — вниз» (top — down) и «снизу — вверх» (bottom — up) [9]. В первом случае наноформы получают в результате раздробления более крупных частиц, во втором в результате сборки наночастиц из молекул или молекулярных ассоциатов. К настоящему времени промышленное применение нашли методы получения наночастиц лекарственных субстанций, основанные на механическом измельчении. Методы, использующие подход «снизу — вверх» (bottom — up), несмотря на очевидные преимущества, в промышленных масштабах не используются.

Подход «сверху — вниз» (top — down) реализуется в ряде физических методов, таких как механическое измельчение в различных типах мельниц [10, 11], гомогенизация под высоким давлением [12] и лазерная абляция [13], которую проводят в органических растворителях, в которых измельчаемое вещество не растворяется. Все эти методы обладают рядом недостатков — их реализация требует больших энергозатрат, получаемые

наночастицы характеризуются широким распределением по размерам и морфологической неоднородностью. Поверхность наноразмерных частиц обладает высокой запасенной энергией и содержит большое число активных центров — атомов с нескомпенсированными химическими и координационно ненасыщенными связями, что приводит к слипанию частиц и образованию агрегатов и агломератов. Для получения мелкодисперсных порошков лекарственных веществ необходимо применение стабилизаторов — органических лигандов, связывающих и блокирующих поверхностные центры наночастиц. В ряде случаев возможна механохимическая (при механическом измельчении) и фотохимическая (при лазерной абляции) деструкция органических веществ. Среди методов, использующих подходы «снизу — вверх» (bottom — up), следует отметить наиболее перспективные методы, основанные на замене растворителя, в том числе технологии, использующие сверхкритические флюиды, и методы, основанные на контролируемом испарении лекарственного вещества и управляемой конденсации молекулярных паров на охлаждаемые поверхности при криогенных температурах.

Суть метода замены растворителя (метода микроосаждения) заключается в следующем: исходное вещество растворяют в подходящем растворителе, далее микроколичество приготовленного раствора быстро, при интенсивном перемешивании, вводят в большое количество антирастворителя. При резком изменении среды происходит микроосаждение [14–16]. Активно развивающейся разновидностью этого метода является использование сверхкритических флюидов в качестве растворителей и осадителей (антирастворителей). В качестве растворителя сверхкритические флюиды используют в методе быстрого расширения: насыщенный раствор вещества распыляют через насадку в флюид, при резком уменьшении давления растворитель испаряется, а вещество распыляется в виде мелкодисперсного аэрозоля [17]. Для измельчения плохо растворимых в флюиде веществ применяют методику, в которой сверхкритический флюид используется в качестве осадителя [18]. Для растворения таких веществ используют органические соединения, хорошо растворяющиеся в сверхкритическом флюиде. Насыщенный раствор целевого вещества вводят через распылительную насадку в емкость с флюидом, в котором соединение из-за резкого уменьшения растворимости кристаллизуется в виде микро- и наночастиц. К недостаткам этого метода относят загрязнение конечного продукта остаточными количествами органического растворителя, а также сложное техническое оформление метода и, соответственно, большую стоимость получаемого продукта. Наночастицы лекарственных веществ получают также в эмульсиях, содержащих раствор вещества в легколетучем растворителе. При испарении растворителя образуются наночастицы, сходные по раз-

мерам с каплями эмульсии. Эмульгирование в сочетании с ультразвуком или гомогенизацией высокого давления позволяет получить капли нанометрового размера [19].

Криохимические методы синтеза и модифицирования наночастиц лекарственных препаратов основаны на сочетании процессов испарения или сублимации и молекулярной конденсации при криогенных температурах. Использование низких температур позволяет достигнуть двух фундаментальных результатов — микронизации лекарственного вещества до наноразмеров и стабилизации метастабильных состояний и кристаллических структур, позволяющих получать новые полиморфные модификации известных препаратов. Низкие температуры необходимы также для предотвращения неконтролируемых превращений промежуточных и целевых продуктов и для управления свойствами получаемых материалов. Можно выделить три основных метода криохимического синтеза наноразмерных порошков лекарственных препаратов:

- первый — криохимический вариант сублимационной сушки,
- второй — статическая высоковакуумная сублимация исходного соединения — низкотемпературная конденсация (статический сублимационный метод),
- третий — динамическая сублимация исходного соединения в потоке нагретого газа — носителя — низкотемпературная конденсация (динамический сублимационный метод).

Ключевые аспекты криохимического варианта сублимационной сушки рассмотрены в работе [20]. Метод включает быстрое замораживание растворов исследуемых веществ с последующей сублимацией растворителя из твердого образца или с использованием метода криоэкстракции [21–22].

Второй и третий варианты криохимического синтеза наноразмерных порошков лекарственных препаратов включают перевод исходной субстанции в газовую фазу путем испарения или сублимации и организацию направленного потока молекул к охлаждаемой поверхности. Взаимодействие потока молекул с охлаждаемой поверхностью приводит к конденсации вещества из газовой фазы с образованием твердых наночастиц [23]. При осуществлении статического сублимационного метода сублимацию осуществляли локальным поверхностным нагревом слоя исходного вещества в высоком вакууме (меньше  $5 \times 10^{-5}$  Торр). Метод позволяет испарять труднолетучие и термически малостабильные органические соединения [24, 25]. В вакууме молекулы, вылетевшие с поверхности исходной субстанции, имеют небольшую кинетическую энергию и, практически не сталкиваясь с другими молекулами, достигают охлаждаемой поверхности. При взаимодействии молекул с холодной поверхностью возможна их конденсация,

отражение и миграция. Для увеличения аккомодации молекул на поверхности понижали температуру с помощью жидкого азота ( $T = -196\text{ }^\circ\text{C}$ ). Молекула при взаимодействии с поверхностью теряет избыток энергии и стабилизируется, формируя ту или иную твердофазную структуру. Высокая скорость потери избыточной энергии на поверхности при температуре жидкого азота обеспечивает малый размер образующихся твердофазных наночастиц и стабилизацию возможных метастабильных кристаллических структур.

При осуществлении статического сублимационного метода испарение или сублимация осуществляется увлечением паров соединения потоком нагретого газа — носителя [26]. При приближении к охлаждаемой поверхности поток газа-носителя с парами вещества резко охлаждается, газовая фаза оказывается многократно пересыщенной относительно упругости паров соединения и в системе создаются условия для быстрого газозофазного зародышеобразования. В свою очередь высокая скорость зародышеобразования и последующий рост микрокристаллитов обедняет газовую фазу парами соединения, что ограничивает дальнейший рост размеров частиц. Уникальность данного метода состоит в том, что в системе, за счет температурного градиента, постоянно воссоздаются условия, способствующие новому зародышеобразованию. Возникшие зародыши новой фазы растут за счет потока молекул или кластеров вещества из газовой фазы. Растущие частицы могут сталкиваться в газовой фазе и агрегировать. Далее сформировавшиеся в газовой фазе наночастицы осаждаются на холодной поверхности и стабилизируются.

Полиморфное модифицирование является важнейшим технологическим резервом повышения эффективности лекарственных веществ [27–36]. Обычно под полиморфизмом вещества понимают его способность существовать в двух или более кристаллических фазах (модификациях), которые имеют различную структуру. Эти структуры отличаются термодинамическими, механическими и спектральными характеристиками. Часто эти характеристики обуславливают значительные изменения биофармацевтических параметров растворения и абсорбции *in vitro* и *in vivo*, стабильности и свойств лекарственных форм. Контроль полиморфного состояния лекарственных средств законодательно закреплен в США, Великобритании, Японии.

Кристаллические модификации лекарственных веществ получают кристаллизацией (преимущественно из растворов и расплавов). Кристаллизационные методы получения полиморфных модификаций из растворов можно разделить на равновесные и неравновесные. Методы равновесной кристаллизации из растворов основаны на изотермическом и изоконцентрационном испарении растворителя из растворов, находящихся в равно-



веси с кристаллами данной полиморфной модификации. Неравновесные методы осуществляются при значительных пресыщениях в системе за счет быстрой кристаллизации, замены растворителя, распылительной или сублимационной сушки.

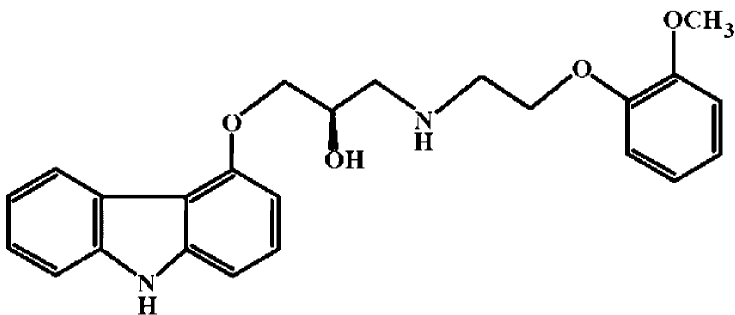
Важными параметрами, которые влияют на процесс кристаллизации полиморфных модификаций лекарственных веществ, являются температура, давление, степень пересыщения, природа растворителя, pH раствора, скорость перемешивания. Причем температура и давление играют решающее значение при выборе условий получения определенных полиморфных модификаций, поскольку определяют условия их стабильности и растворимости [37–47]. В последнее время исследуются новые способы кристаллизации: кристаллизация под действием поляризованного света (лазерное излучение), с использованием растворителей в сверхкритическом состоянии.

Если кристаллическая структура нарушается таким образом, что исчезает дальний порядок (упорядоченность во взаимном расположении атомов или молекул на неограниченно больших расстояниях), говорят об аморфизации образца. При этом размер частиц может уменьшаться или же сохраняться. Аморфизация — один из самых распространенных в настоящее время способов получения растворимых форм лекарственных веществ. Образованию и сохранению аморфных состояний способствует механическая обработка совместно со вспомогательными веществами. Например, аморфизация вещества происходит при его измельчении в мельницах [48].

В данной главе приведены конкретные примеры криохимического синтеза наноразмерных порошков лекарственных веществ.

## 1.1. Карведилол

Карведилол — кардиологический препарат, относящийся к классу  $\alpha$ - и  $\beta$ -адреноблокаторов. Химическая формула соединения:



Для криохимической модификации карведилола использовали метод сублимации в потоке газа — носителя, сочетаемый с низкотемпературной конденсацией (динамический сублимационный метод). Криохимическим способом получен аморфный порошок [49, 50]. Методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР  $^{13}\text{C}$ , ЯМР  $^1\text{H}$ ) была установлена идентичность исходного карведилола и полученного рентгеноаморфного порошка. Анализ препарата на чистоту проведен методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ВЭЖХ ОФ. Суммарное содержание примесей в аморфном карведилоле не превышает 1%, что соответствует нормативному документу НД 42-11503-01 на лекарственную субстанцию карведилола. Таким образом, данные ЯМР-спектроскопии, ТСХ и ВЭЖХ свидетельствуют, что полученное при криомодифицировании вещество является карведилолом.

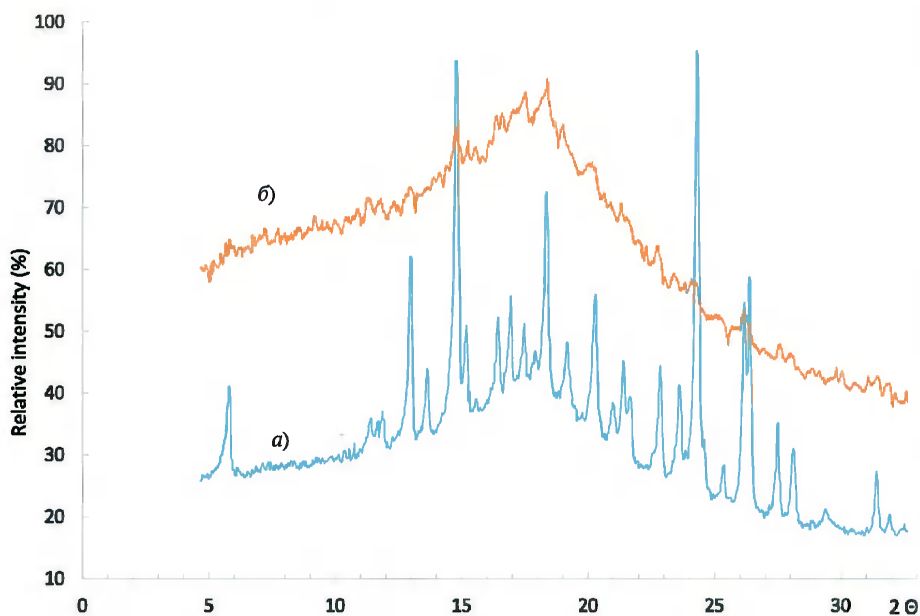
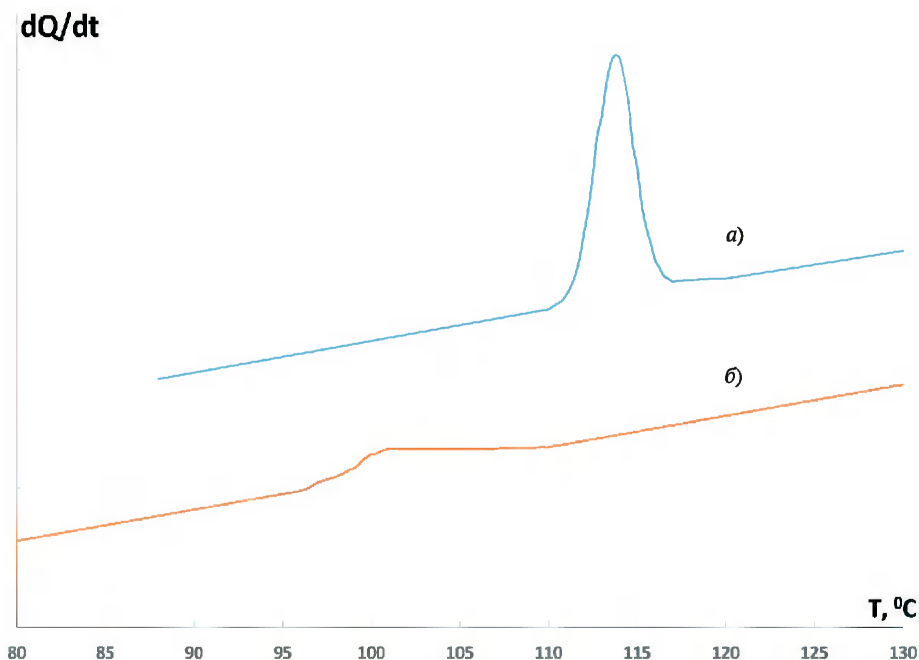


Рис. 1.1. Рентгенограммы образцов карведилола: а) — исходного фармакопейного, б) — криохимически модифицированного

Для определения структурных и термических свойств криоформы карведилола были проведены рентгенофазовый анализ, исследования методом ИК-спектроскопии и дифференциальная сканирующая калориметрия полученных образцов. По данным рентгенофазового анализа (РФА), криомодифицированное вещество является рентгеноаморфным. Спектр исходной субстанции карведилола характеризуется наличием набора дифракционных максимумов, что свидетельствует о ее кристаллическом состоянии (рис. 1.1). ИК-спектроскопическое исследование показало, что спектры ис-

ходного и аморфного карведилола различаются в области  $1000\text{--}800\text{ см}^{-1}$  вследствие конформационных различий.

Результаты дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) свидетельствуют о том, что плавление исходной субстанции карведилола характеризуется одним эндотермическим эффектом при температуре  $114\text{ }^\circ\text{C}$ , а плавление полученного с применением низких температур карведилола фиксированной температуры плавления не имеет (рис. 1.2). Гранулометрическое исследование исходного и криомодифицированного карведилола методом оптической микроскопии показывает, что наряду с аморфизацией криомодификация позволяет уменьшить размеры частиц от исходных (более  $10\text{ мкм}$ ) до размеров менее  $1\text{ мкм}$ .



**Рис. 1.2.** Кривые разогрева образцов карведилола: *а*) — исходный фармакопейный карведилол, *б*) — криохимически модифицированный карведилол

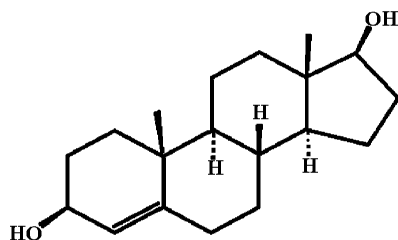
Биологическую активность аморфного карведилола проверяли на двух группах крыс, которым вводили исходный кристаллический и аморфный криомодифицированный карведилол. Проводили регистрацию системного артериального давления через имплантированные катеторы. Найдено, что аморфный препарат увеличивает межсистолический интервал у животных, что, вероятно, обусловлено блокадой  $\beta_1$ -адренорецепторов сердца. Это приводит к снижению коэффициента барорефлекса на введение животным фенилэфрина и изопротеренола и свидетельствует об увеличении

биоактивности криомодифицированного карведилола по сравнению с исходным.

## 1.2. 5-Андростендиол-3 $\beta$ ,17 $\beta$

5-Андростендиол-3 $\beta$ ,17 $\beta$  — природный гормон, обладающий ярко выраженными иммуностимулирующими и радиопротекторными свойствами [51]. Химическая формула соединения приведена ниже.

Для криохимической модификации 5-андростендиола-3 $\beta$ ,17 $\beta$  использовали метод сублимации в потоке газа — носителя в сочетании с низкотемпературной конденсацией. Получен наноразмерный моногидрат 5-андростендиола-3 $\beta$ ,17 $\beta$ . По данным тонкослойной хроматографии (ТСХ) содержание примесей в исходном и криохимически модифицированном образцах составляло менее 0,5%.



Данные ДСК и термогравиметрии (NETZCH STA 449 C), свидетельствуют о том, что исходный и криохимически модифицированный 5-андростендиол-3 $\beta$ ,17 $\beta$  представляют собой моногидрат, причем пик дегидратации для исходного 5-андростендиола-3 $\beta$ ,17 $\beta$  лежит в интервале 110–147 °С, а для криохимически модифицированного — в пределах 102–128 °С. Температура плавления исходного и криохимически модифицированного 5-андростендиола-3 $\beta$ ,17 $\beta$  — практически совпадают — 187 и 188 °С, соответственно.

Рентгенофазовый анализ (РФА) (RIGAKU D/MAX-2500, Япония) криохимически модифицированного 5-андростендиола-3 $\beta$ ,17 $\beta$  показал, что его кристаллографическая структура соответствует известной структуре, приведенной в кембриджской базе кристаллографических данных с параметрами:  $a = 6,250 \text{ \AA}$ ,  $b = 12,143 \text{ \AA}$ ,  $c = 23,440 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ,  $V = 1779,0 \text{ \AA}^3$ ,  $Z = 4$ ,  $\rho_{\text{выч}} = 1,152 \text{ мг/м}^3$  пространственная группа симметрии  $P2_12_12_1$ .

По данным оптической микроскопии («Karl Zeiss, Jena»), размер исходных частиц находится в диапазоне от 8-594 мкм. Размер и форму ча-

стиц криохимически модифицированного 5-андростендиола-3 $\beta$ ,17 $\beta$  определяли методом сканирующей электронной микроскопии (JEOL JSM 6490-LV, JSM 7001 F и HITACHI TM-1000). По форме и размеру частиц криохимически модифицированный 5-андростендиол-3 $\beta$ ,17 $\beta$  обладает высокой степенью монодисперсности, частицы препарата представляют вытянутые палочки с закругленными концами, их средний продольный размер составляет  $219 \pm 9$  нм [52].

### 1.3. Феназепам

Феназепам — высокоэффективный анксиолитический препарат, разработанный в СССР в 70-х годах [53]. Химическая структура соединения приведена ниже.

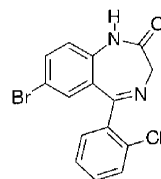
Известна одна кристаллическая модификация феназепама, для которой методом рентгенофазового анализа (РФА) определен набор дифракционных максимумов и их интенсивности [54].

Для криохимической модификации феназепама использовали метод сублимации в потоке газа — носителя в сочетании с низкотемпературной конденсацией. Методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), тонкослойной хроматографии и УФ-спектроскопии была установлена идентичность состава исходного и криохимически модифицированного феназепама.

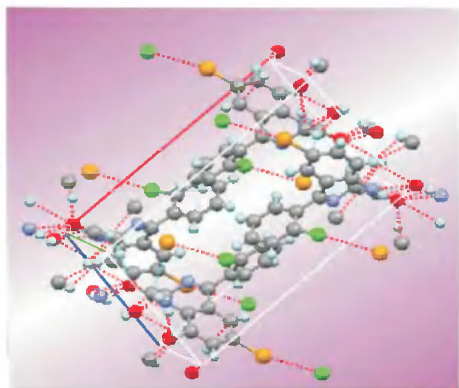
Подлинность исходного фармакопейного и полученного нами криохимически модифицированного феназепама определяли по методике, представленной в ФС 42-2411-99 спектрофотометрическим методом в УФ-области.

Таким образом, при криохимической модификации фармакопейного феназепама превращения вещества не происходит и полученное из исходного фармакопейного феназепама вещество является 7-бром-1,3-дигидро-5-(2-хлорфенил)-2Н-1,4-бензодиазепин-2-оном. Для определения свойств наномодификации феназепама проведены: рентгенофазовый (п-РФА) и порошковый рентгеноструктурный (п-РСА) анализы, ИК-спектроскопия, термоаналитические исследования, определение диаметра частиц и определение скорости растворения в воде.

Сравнение результатов рентгенофазового анализа (РФА), проведенного на дифрактометре Rigaku D/MAX-2500 (Rigaku, Япония) на  $\text{CuK}\alpha$  излучении, исходного и криомодифицированного феназепама свидетельствует о получении новой кристаллической  $\beta$ -модификации 7-бром-1,3-дигидро-5-(2-хлорфенил)-2Н-1,4-бензодиазепин-2-она.



Кристаллическую структуру определяли методом порошкового рентгеноструктурного анализа. Рентгенограмму получали в рентгеновской порошоковой камере Гинье G370 ( $\text{CuK}_{\alpha 1}$ -излучение,  $\lambda = 1,54059 \text{ \AA}$ , съемка на просвет) в области углов  $2\theta = 5\text{--}80^\circ$  в течение 8 ч. На измеренной порошковой рентгенограмме были уточнены положения первых 35 пиков, по которым проведено индцирование в моноклинной ячейке с помощью программы TREOR90. Систематические погасания, выявленные при уточнении порошковой рентгенограммы методом Паули программой MR1A, позволили установить пространственную группу  $P2_1/c$ .



**Рис. 1.3.** Элементарная кристаллическая ячейка новой  $\beta$ -модификации феназепама: пространственная группа  $P2_1/c$ ,  $a = 14,792(5) \text{ \AA}$ ,  $b = 11,678(3) \text{ \AA}$ ,  $c = 8,472(2) \text{ \AA}$ ,  $\beta = 93,677(19)^\circ$ ,  $V^3 = 1460,4(7) \text{ \AA}^3$ ,  $\rho_{\text{выч.}} = 1,59 \text{ г/см}^3$ ,  $Z = 4$

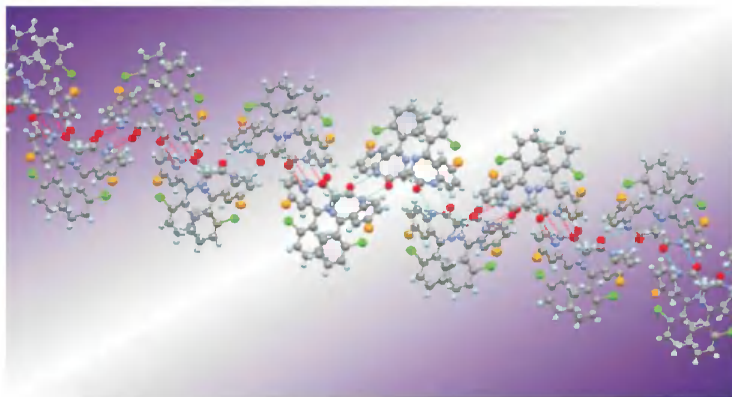
ны в рассчитанные положения и не уточнялись.

Для новой структуры получены параметры кристаллической решетки: тип — моноклинная,  $a = 14,792(5) \text{ \AA}$ ,  $b = 11,678(3) \text{ \AA}$ ,  $c = 8,472(2) \text{ \AA}$ ,  $\beta = 93,677(19)^\circ$ ,  $V^3 = 1460,4(7) \text{ \AA}^3$ ,  $\rho_{\text{выч.}} = 1,59 \text{ г/см}^3$ ,  $Z = 4 \text{ C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OClBr}$ , пространственная группа  $P2_1/c$  (рис. 1.3, 1.4). Сравнение полученных результатов с известными из литературы [53] свидетельствует о том, что полученное из фармакопейного феназепама, вещество является новой кристаллической модификацией 7-бром-1,3-дигидро-5-(2-хлорфенил)-2Н-1,4-бензодиазепин-2-она, названной нами  $\beta$ -модификацией, со своими индивидуальными параметрами кристаллической решетки. Подробные данные о новой  $\beta$ -модификации феназепама приведены в работах [55, 56] и введены в Кембриджскую базу кристаллографических данных.

Кристаллическую структуру новой кристаллической  $\beta$ -модификации решали методом симулированного отжига и уточняли методом Ритвельда программой MR1A. Профили пиков описывали модифицированной функцией Войта. Эффект текстуры учитывали в рамках модели Марча–Долласа — направление преимущественной ориентации 001, уточненное значение параметра  $r = 0,93(1)$ . В процессе уточнения накладывались ограничения на допустимые отклонения длин связей и внутримолекулярных межатомных расстояний. Для неводородных атомов уточняли параметры изотропных тепловых колебаний,  $U_{\text{iso}}$ . Атомы водорода были помещены в рассчитанные положения и не уточнялись.

Анализ ИК-спектров исходной субстанции феназепам и полученной  $\beta$ -модификации показывает, что в областях  $600\text{--}700\text{ см}^{-1}$ ;  $800\text{--}900\text{ см}^{-1}$ ;  $1350\text{--}1400\text{ см}^{-1}$  и  $1600\text{--}1700\text{ см}^{-1}$  спектры различаются.

Термоаналитические исследования проводили на термоанализаторе STA 449 C Jupiter (NETZSCH) в токе аргона при повышении температуры  $10\text{ град/мин}$ . Кривые ДСК исходного образца феназепам и  $\beta$ -криомодифицированного различаются. На кривой фармакопейного феназепам в диапазоне  $(207\text{--}212)\text{ }^\circ\text{C}$  присутствует дополнительный эндотермический пик. Полученные результаты показали, что использование термического анализа позволяет различать исходную субстанцию феназепам и его новую кристаллическую  $\beta$ -модификацию. Температуры плавления образцов, определенные из ДСК-кривых, а также установленные согласно ГФ 11 издания (метод 1А — в капилляре) оказались равными  $226\text{--}227\text{ }^\circ\text{C}$ , что отвечает требованиям ФС 42-2411 — 99.



**Рис. 1.4.** Дополнительное зигзагообразное упорядочение в новой кристаллической  $\beta$ -модификации феназепам

Определение диаметра частиц проводили по микрофотографиям, полученным на сканирующем электронном микроскопе JSM 6380 LA при увеличениях  $\times 1000\text{--}20\,000$ . Диаметр частиц исходного феназепам равен  $10\text{--}120\text{ мкм}$ , а криомодифицированного —  $50\text{--}300\text{ нм}$  в зависимости от условий получения. В указанном диапазоне находятся и размеры частиц криофеназепам, оцененные из рентгеновские спектров и из данных по величине поверхности.

Кинетику растворения исходного и нанофеназепам изучали в соответствии с ГФ, вып. 2, с. 154. Результаты представлены на рис. 1.5. Новая кристаллическая  $\beta$ -модификация в воде растворяется быстрее по сравнению с исходной субстанцией. Кроме того, новая кристаллическая  $\beta$ -модификация при растворении в воде образует пересыщенные, почти на  $30\text{ мас.}\%$ , водные растворы. Проведенные эксперименты показали, что новая кристалличе-

ская  $\beta$ -модификация более активна по сравнению с исходной субстанцией, что должно повлиять на ее биодоступность и возможный терапевтический эффект.

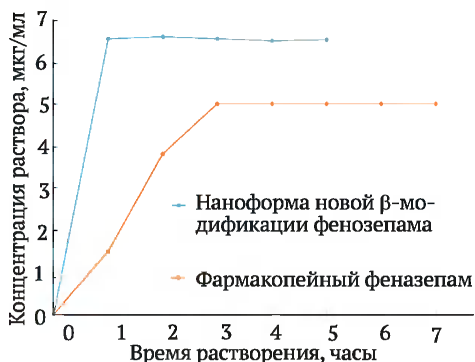


Рис. 1.5. Кинетика растворения различных форм феназепама в воде



Рис. 1.6. Результаты биологических испытаний различных форм феназепама на анксиолитическую активность тестируемых животных

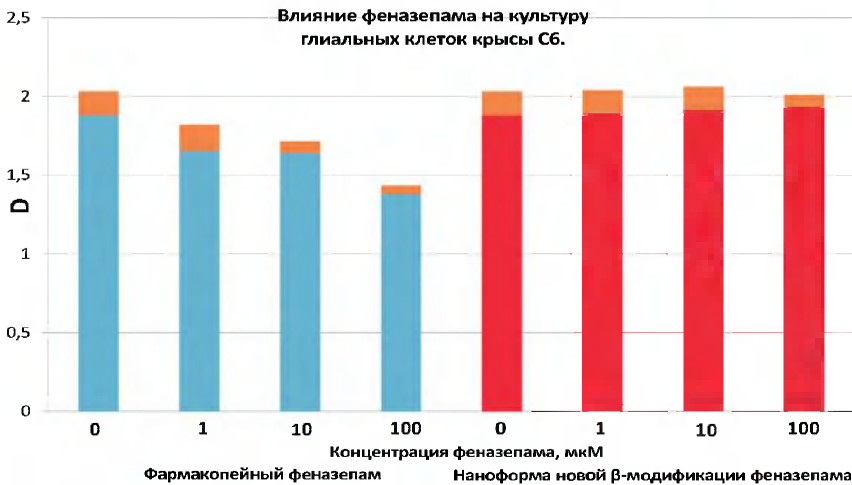
Испытания на глиальных клетках крысы С6 показали, что наноформа феназепама обладает меньшей токсичностью (рис. 1.6). Испытания также показали, что криохимически модифицированный феназепам обладает увеличенной анксиолитической, то есть противотревожной активностью и уменьшенным побочным седативным действием (рис. 1.7). Зафиксировано многократное снижение побочного миорелаксантного действия: доза ЭД<sub>50</sub> для наноформы феназепама примерно в пять раз выше по сравнению с известной. Биологические испытания на крысах показали, что композиция на основе новой кристаллической  $\beta$ -модификации феназепама обладает



большей анксиолитической активностью, значительно уменьшенной седативной активностью [57] (рис. 1.8).



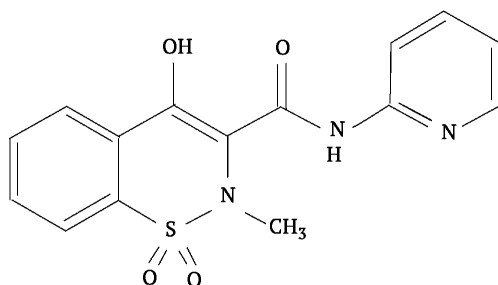
**Рис. 1.7.** Результаты биологических испытаний различных форм феназепама на седативный эффект тестируемых животных



**Рис. 1.8.** Зависимость оптической плотности раствора глиальных клеток крысы С6 от концентрации феназепама/  $\beta$ -модификации феназепама

## 1.4. Пироксикам

Пироксикам — эффективный нестероидный противовоспалительный препарат класса оксикамов. Данный препарат используется в лечении ревматоидного остеоартрита, первичной дисменореи, послеоперационной боли, может действовать как анальгетик, особенно в тех случаях, когда имеет место осложняющий воспалительный процесс. Структурная формула соединения приведена ниже.



Впервые препарат был выпущен фирмой «Phizer» под торговой маркой «Felden» в 1980 г. Использование фармакопейных форм пироксикама в лечебной практике осложняется большим количеством побочных эффектов, связанных с негативным воздействием пироксикама на центральную нервную, сердечно-сосудистую и дыхательную системы, желудочно-кишечный тракт.

В работе использовали пироксикам, синтезированный в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского (лаборатория химии карбофункциональных соединений под руководством профессора А.С. Медведевой). Подлинность исходного фармакопейного и полученного нами криохимически модифицированного пироксикама определяли по методике, представленной в ФС 42-0271-07 по ИК-Фурье-спектру в диске с бромидом калия по полосам поглощения в области 4000 — 400 см<sup>-1</sup>.

Для получения наноразмерных порошков пироксикама использовали метод динамической сублимации в потоке нагретого газа — носителя с последующей низкотемпературной конденсацией (динамический сублимационный метод). Для характеристики исходного фармакопейного и криохимически модифицированного пироксикама использовали методы ИК-Фурье-спектроскопии («Икар» производства ЗАО НПФ «Микротех», Россия), порошкового рентгенофазового анализа (п-РФА) («EMPYREAN» производства PANalytical Голландия), термогравиметрические измерения (STA 449 F1 Jupiter<sup>®</sup> производства «NETZSCH», Германия), термомикроскопи-

ческие исследования («OLYMPUS BX41» производства «Olympus Optical Co., LTD»). Размеры частиц оценивали с использованием просвечивающей электронной микроскопии («LEO 912 AB Omega» производства «ZEISS», Германия), а также посредством измерения эффективной поверхности путем определения количества адсорбированного на образцах аргона хроматографическим методом (Хром 5, Россия).

Совокупность полученных данных позволяет сделать вывод, что криохимически модифицированный пироксикам представляет собой чистую форму III, которая является термодинамически метастабильной [58]. Данная форма известна уже более тридцати лет, однако ее кристаллографическая структура была распифрована сравнительно недавно [59]. Ее кристаллографические параметры: пространственная группа P-1;  $a = 8,0106(17) \text{ \AA}$ ,  $b = 10,080(2) \text{ \AA}$ ,  $c = 10,519(3) \text{ \AA}$ ;  $\alpha = 81,215(9)^\circ$ ,  $\beta = 69,330(5)^\circ$ ,  $\gamma = 69,827(6)^\circ$ . Средний размер частиц криохимически модифицированного пироксикама составляет:  $d_{\text{ср}} = 300 \pm 30 \text{ нм}$ .

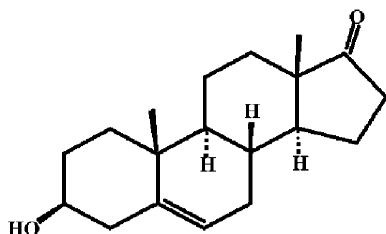
При нагревании наноформа полиморфной модификации III пироксикама претерпевает последовательные превращения: при температуре  $125^\circ\text{C}$  происходит укрупнение частиц с образованием игольчатых кристаллов, характерных для полиморфной модификации II, хорошо видимых на оптическом микроскопе. При температуре  $160^\circ\text{C}$  происходит исчезновение игольчатых кристаллов с образованием кристаллов кубической формы, характерных для термодинамически стабильной формы I.

В результате выдерживания криохимически синтезированной наноразмерной формы пироксикама при комнатной температуре в герметичном защищенном от воздействия солнечного света контейнере в течение четырех лет не произошло изменения структурно-размерных характеристик препарата.

## 1.5. Дегидроэпиандростерон (ДГЕА)

Дегидроэпиандростерон (ДГЕА) — эндогенный стероидный гормон, выполняющий многочисленные важные функции в организме человека, его называют гормоном здоровья и долголетия [60]. Содержание ДГЕА достигает максимума к 25 годам и постепенно уменьшается по мере взросления. Таким образом, многие возрастные болезни коррелируют с низким уровнем ДГЕА. Заместительная терапия физиологическими дозами ДГЕА при его эндогенном дефиците позволяет предотвратить или облегчить развитие многих заболеваний, связанных со старением.

Структурная формула соединения приведена на следующей странице.



Для криохимической модификации ДГЕА использовали как динамический, так и статический сублимационные методы. В качестве исходной субстанции использовали ДГЕА производства фирмы Acros Organics (Бельгия).

Подлинность исходного фармакопейного и полученного нами криохимически модифицированного ДГЕА подтверждали методами ИК-Фурье спектроскопии и порошкового рентгенофазового анализа (п-РФА). Анализ препарата на чистоту проведен методами масс-спектрометрии и ВЭЖХ. Суммарное содержание примесей в исходном фармакопейном и криохимически модифицированном ДГЕА не превышало 0,5%.

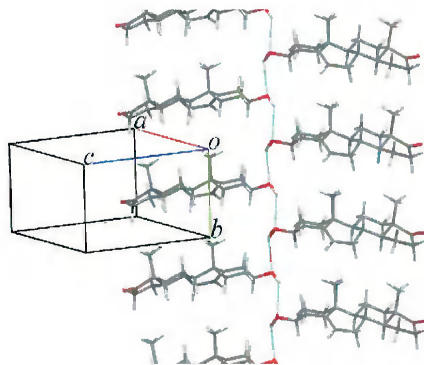
Для характеристики исходного фармакопейного и криохимически модифицированного ДГЕА использовали методы ИК-Фурье спектроскопии («Tensor II» производства фирмы «Bruker» Германия), порошкового рентгенофазового анализа (п-РФА) («EMPYREAN» производства Голландия), порошкового рентгеноструктурного анализа (п-РСА) (Huber G670 Guinier camera производства) термогравиметрические измерения (STA 449 F1 Jupiter<sup>®</sup> производства «NETZSCH», Германия), термомикроскопические исследования («OLYMPUS BX41» производства «Olympus Optical Co., LTD»). Размеры частиц оценивали с использованием просвечивающей электронной микроскопии («LEO 912 AB Omega» производства «ZEISS», Германия), а также посредством измерения эффективной поверхности путем определения количества адсорбированного на образцах аргона хроматографическим методом (Хром 5, Россия).

До последнего времени было известно шесть полиморфных модификации безводного ДГЕА. Из них только три (FI, FII, FVI) были охарактеризованы рентгеноструктурными исследованиями [61–64]. С использованием динамического сублимационного метода были получены наноформы новой полиморфной модификации ДГЕА, названной, согласно принятой классификации, как FVII [65]. Кристаллографическая структура формы FVII расшифрована методом порошкового рентгеноструктурного анализа [66]. Ее кристаллографические параметры: пространственная группа  $P2_1$ ;  $a =$

$= 13,105(2) \text{ \AA}$ ,  $b = 5,9034(18) \text{ \AA}$ ,  $c = 10,829(2) \text{ \AA}$ ;  $\alpha = 90,00^\circ$ ,  $\beta = 97,64(2)^\circ$ ,  $\gamma = 90,00^\circ$ ,  $Z = 2$  (рис. 1.9). Параллельно с образованием новой полиморфной модификации FVII было зафиксировано наличие в криохимически модифицированных образцах еще одной полиморфной модификации FVIII, которая проявляется на рентгенограммах в виде небольшого количества уширенных пиков. Соотношение форм FVII/FVIII составляло 3:1.

Было обнаружено, что фазовый состав получаемых в результате криохимического синтеза, осуществляемого динамическим сублимационным методом с использованием газа-носителя, зависит от природы газа-носителя. Например, при использовании гелия в качестве газа-носителя, основной фазой является фаза FIII. Эта фаза известна более 20 лет, однако до последнего времени ее кристаллографическая структура не была расшифрована, что было связано с трудностью ее получения в чистом виде. Использование гелия в качестве газа — носителя при криохимическом синтезе наноформ ДГЕА, а также дополнительная термообработка, позволила получить образцы с практически стопроцентным содержанием фазы FIII, что позволило расшифровать кристаллографическую структуру [66]. Кристаллографические параметры фазы FIII ДГЕА: пространственная группа  $P2_1$ ;  $a = 14,5339(18) \text{ \AA}$ ,  $b = 10,3792(14) \text{ \AA}$ ,  $c = 11,8253(2) \text{ \AA}$ ;  $\alpha = 90,00^\circ$ ,  $\beta = 111,559(18)^\circ$ ,  $\gamma = 90,00^\circ$ ,  $Z = 4$  (рис. 1.10).

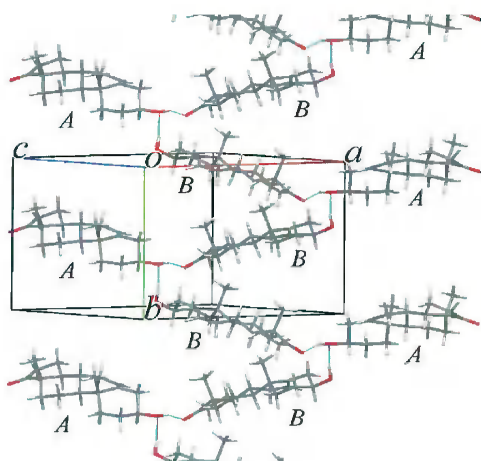
**Рис. 1.9.** Фрагмент кристаллической структуры новой полиморфной модификации FVII ДГЕА: пространственная группа  $P2_1$ ,  $a = 13,105(2) \text{ \AA}$ ,  $b = 5,9034(18) \text{ \AA}$ ,  $c = 10,829(2) \text{ \AA}$ ;  $\alpha = 90,00^\circ$ ,  $\beta = 97,64(2)^\circ$ ,  $\gamma = 90,00^\circ$ ,  $Z = 2$



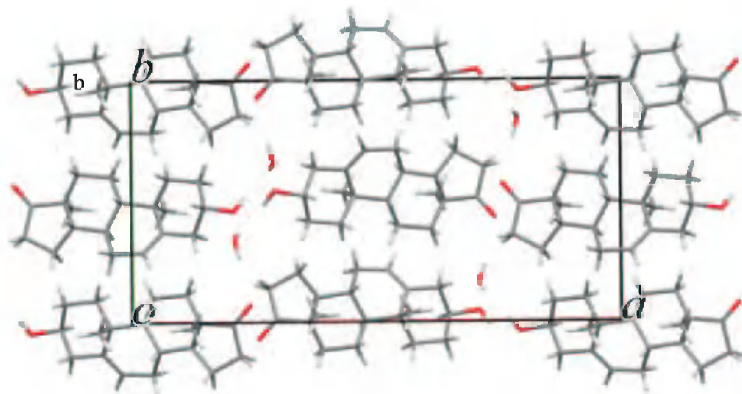
При выдерживании образцов наноформы ДГЕА, содержащих фазы FVII и FVIII в соотношении 75% : 25%, в условиях стопроцентной влажности при комнатной температуре, зафиксировано образование нового кристаллогидрата S5 состава 1:1 с кристаллографической структурой S5, расшифрованной в [66]. Кристаллографические параметры кристаллогидрата S5 ДГЕА: пространственная группа  $P2_12_12_1$ ;  $a = 22,506(3) \text{ \AA}$ ,  $b = 11,197(2) \text{ \AA}$ ,  $c = 6,8094(18) \text{ \AA}$ ;  $\alpha = 90,00^\circ$ ,  $\beta = 90,00^\circ$ ,  $\gamma = 90,00^\circ$ ,  $Z = 4$ .

При исследовании полиморфных модификаций ДГЕА [59–61] обнаружено новое явление — влияние природы инертного газа-носителя, темпера-

туры конденсации и сублимации, а также других параметров криохимического синтеза на размер частиц и фазовый состав получаемых наночастиц ДГЕА. Учет таких зависимостей позволит разработать криохимические методы получения полиморфов ДГЕА с заданными свойствами.



**Рис. 1.10.** Фрагмент кристаллической структуры полиморфной модификации ГШ ДГЕА: пространственная группа  $P2_1$ ,  $a = 15,5339(18) \text{ \AA}$ ,  $b = 10,3792(14) \text{ \AA}$ ,  $c = 11,8253(14) \text{ \AA}$ ,  $\beta = 111,559(4)^\circ$ ,  $V = 1659,1(4) \text{ \AA}^3$ ,  $\rho_{\text{выч.}} = 1,155 \text{ г/см}^3$ ,  $Z = 2,2$



**Рис. 1.11.** Фрагмент кристаллической структуры кристаллогидрата ДГЕА S5: вид вдоль оси с полиморфной модификации ГШ ДГЕА:  $P2_12_12_1$ ,  $a = 22,506(3) \text{ \AA}$ ,  $b = 11,197(2) \text{ \AA}$ ,  $c = 6,8094(18) \text{ \AA}$ ,  $\beta = 90,00^\circ$ ,  $V = 1716,0(6) \text{ \AA}^3$ ,  $\rho_{\text{выч.}} = 1,186 \text{ г/см}^3$ ,  $Z = 4$

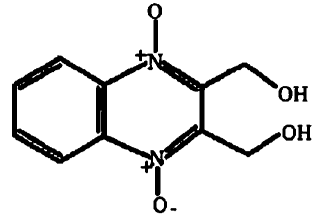
## 1.6. Диоксидин

Диоксидин 2,3-бис-(гидроксиметил)хиноксалин-*N, N'*-диоксид — широко используемое анти-микробное средство, эффективно ингибирующее рост большого числа грамположительных и грамотрицательных бактерий [68].

Исходный порошок диоксидина был подвергнут криохимической модификации с использованием двух методов: сублимационной сушки замороженного водного раствора и сублимации-низкотемпературной конденсации. Субстанцию диоксидина, соответствующую фармакопейной статье (ФС) 42-2308-97, использовали без дополнительной очистки. Синтез по методу сублимационной сушки проводился следующим образом. В колбу с 50 мл дистиллированной воды добавили 0,5 г порошка диоксидина [69–71]. Полученный раствор при перемешивании нагрели до кипения, распылили через пневматическую форсунку в жидкий азот ( $T_{\text{кип}} = -195,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , скорость замораживания 60 град/мин) и подвергли лиофильной сушке в течение 24 часов. Вторым способом синтеза был метод сублимации и низкотемпературной конденсации. Поток создавал  $\text{CO}_2$ , давление в системе поддерживали в диапазоне 0,001–0,0005 атм, температура, при которой проходило испарение, составила 80  $^{\circ}\text{C}$ . Конденсацию проводили на охлаждаемую жидким азотом стеклянную поверхность. Для криосинтеза было взято 100 мг диоксидина, выход составил 51% (51 мг диоксидина).

Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) исходного и полученного вещества снимали в насыщенном растворе в дейтерированной воде ( $D_2O$ ) на ЯМР-спектрометре высокого разрешения VXR-400 фирмы «VARIAN» (США). УФ-спектры различных форм диоксидина (в диапазоне 200–500 нм, разрешение 0,5 нм), кинетику растворения регистрировали по изменению поглощения при  $\lambda = 374,5$  нм на УФ-спектрофотометре Jasco V-770 (Япония). ИК-спектры порошков образцов получали в интервале 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  на спектрометре Bruker Tensor II (Германия) с приставкой ATR platinum. Регистрацию ИК-спектров порошкообразных образцов осуществляли по методике диффузного отражения.

Рентгенофазовый анализ исходной субстанции и полученного из нее вещества проводили на дифрактометре Rigaku D/MAX-2500 (Rigaku, Япония) на  $\text{CuK}\alpha$  излучении ( $\lambda = 1,54056\text{ \AA}$ ). Съемку осуществляли в интервале углов  $2\theta$  от 10 до 60 $^{\circ}$ . А также порошковые рентгенодифракционные исследования были выполнены при 250 К, источник линия ID22 Европейского Центра синхротронного излучения (ESRF, Гренобль, Франция)



и кристаллографические структуры расшифрованы проф. В.В. Чернышевым (МГУ, химический факультет) [72].

Термоаналитические исследования (термогравиметрию-ТГ и дифференциальную сканирующую калориметрию-ДСК) проводили на дифференциальном сканирующем калориметре DSC 204 F1 Phoenix (NETZSCH, Германия); термогравиметрическом анализаторе TG 209 F1 Perseus (NETZSCH, Германия). Нагрев от 25 °С до 400 °С со скоростью 10 °С/мин, охлаждение с 400 °С до 25 °С с той же скоростью, среда — аргон, а навеска 5–10 мг.

Микроструктуру образцов изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на электронном микроскопе LEO 912 AB Omega (ZEISS, Germany) при увеличениях до 500 000. Определение удельной поверхности ( $S_{уд}$ ) нанокмозитов проводили методом тепловой десорбции аргона на установке на базе хроматографа Хром 5. Предварительно адсорбированные газы удалялись с поверхности образцов на вакуумной установке. Средний размер частиц ( $a$ ) рассчитывали по формуле:

$$a = 6/\rho S_{уд},$$

где  $\rho$  — плотность диоксида.

Определение антибактериальной активности различных модификаций диоксида осуществляли диско-диффузионным методом [73], с использованием прессованных таблеток и дисков фильтровальной бумаги, пропитанных растворами исходного и криомодифицированного лекарственных препаратов. В качестве тест-культур использовали бактерии, полученные из коллекции культур кафедры микробиологии, биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова: *E. coli* 52, *S. aureus* 144, *M. cyanum* 98, *B. cereus* 9. Эксперименты проводили в чашках Петри, содержащих 20 мл агаризованной питательной среды, подсушенной в течение суток (толщина слоя среды 4 мм). Измерение зон подавления роста (ЗПР) тест-культур проводили через 16 и 48 часов инкубации.

Метод ЯМР был использован для подтверждения того, что в ходе криохимической модификации диоксид не изменил химического состава. Близость ЯМР- $^1\text{H}$  — спектров исходного диоксида ( $D_2O$ )  $\delta$ : 4,93–5,21 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 7,85–8,05 (m, 2H, H Ar), 8,38–8,52 (m, 2H, H Ar), криомодифицированного методом сублимационной сушки ( $D_2O$ )  $\delta$ : 4,95–5,25 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 7,86–8,05 (m, 2H, H Ar), 8,35–8,50 (m, 2H, H Ar) и криомодифицированного методом сублимации — низкотемпературной конденсации ( $D_2O$ )  $\delta$ : 4,93–5,23 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 7,86–8,05 (m, 2H, H Ar), 8,37–8,53 (m, 2H, H Ar) подтверждает, что криомодифицированное вещество является диоксидом.

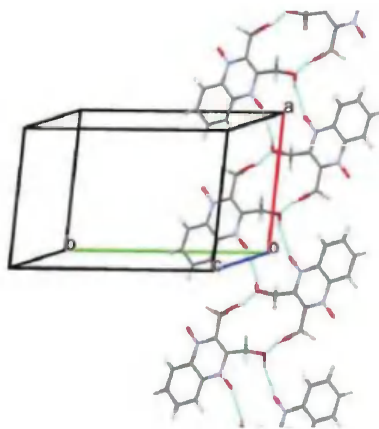
УФ-спектры водных растворов фармакопейного диоксида и модифицированных методами сублимационной сушки и сублимации — низкотемпературной конденсации оказались идентичны. На спектрах наблюдаются



характерные для диоксидина пики при 250 нм (дублет 241 и 259 нм), относящийся к  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходу электронов ароматической системы, и при 375 нм, относящийся к  $n \rightarrow \pi^*$  переходу  $n$ -электронов атома азота.

Однако рентгеновские дифрактограммы, а также набор межплоскостных расстояний ( $d$ , Å) и интенсивностей ( $I_{\text{отн}}$ , %), рассчитанных их основании исходного фармакопейного ( $d$ , Å —  $I_{\text{отн}}$ , %: 8,638–100,0%; 7,897–21,8%; 7,508–68,4%; 6,846–12,2%; 4,489–12,7%; 3,752–11,5%; 3,424–10,3%; 3,299–24,8%; 3,231–14,9%; 3,192–6,8%; 3,075–5,5%; 2,992–5,1%; 2,882–5,0%), криомодифицированного методов сублимационной сушки ( $d$ , Å —  $I_{\text{отн}}$ , %: 8,740–100,0%; 8,026–94,2%; 7,546–22,3%; 6,899–57,8%; 6,681–24,4%; 6,288–50,9%; 5,978–43,4%; 5,723–9,7%; 5,371–11,5%; 5,177–17,1%; 4,952–29,5%; 4,498–19,4%; 4,345–23,9%; 4,072–25,3%; 4,013–17,6 %; 3,905–20,5%; 3,678–28,4%; 3,526–12,7%; 3,440–30,0 %; 3,358–99,3 %; 3,304–67,6%; 3,206–31,6%; 3,145–18,3%; 2,981–11,4%; 2,890–12,9%; 2,793–9,7%; 2,677–7,5%; 2,613–9,8%; 2,535–8,9%; 2,470–8,1%; 2,370–9,9%; 2,287–7,5%; 2,244–9,0%; 2,079–7,1%; 1,963–6,7%; 1,703–7,0%;) и методом сублимации — низкотемпературной конденсации диоксидина ( $d$ , Å —  $I_{\text{отн}}$ , %: 8,772–100,0%; 8,069–95,0%; 6,946–52,8%; 6,306–45,4%; 5,999–37,4%; 5,196–15,8%; 4,954–24,7%; 4,514–17,4%; 4,356–20,8%; 4,094–22,2%; 3,923–17,8%; 3,686–23,9%; 3,452–24,7%; 3,367–84,0%; 3,318–56,1%; 3,221–26,57% оказались различными, что свидетельствует об изменении кристаллической формы диоксидина в ходе криохимической модификации.

**Рис. 1.12.** Кристаллическая упаковка в М-фазе, описывающая классические межмолекулярные водородные связи О–Н...О (тонкие голубые линии), цепочечные структуры расположены вдоль направления [100]



Методом порошковой рентгеновской дифракции показано формирование трех полиморфных кристаллических фаз для криомодифицированной формы диоксидина — 2 безводные фазы триклинная (Т) и моноклинная (М) и одна гидратная форма (Н) [72]. Кристаллографические данные

(табл. 1.1) и особенности молекулярных упаковок и межмолекулярных водородных связей в безводных полиморфных кристаллических фазах М и Т приведены ниже на рис. 1.12 и рис. 1.13.

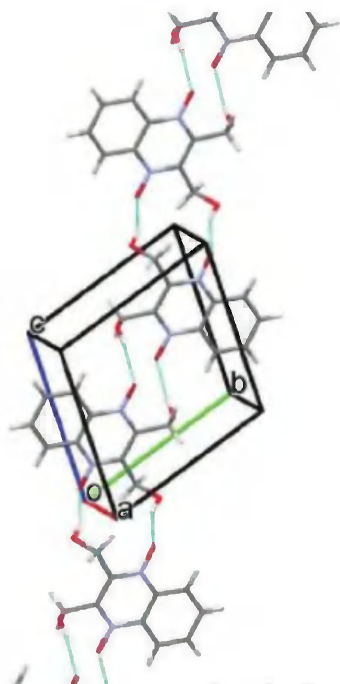


Рис. 1.13. Кристаллическая упаковка в Т-фазе, описывающая классические межмолекулярные водородные связи O—H...O (тонкие голубые линии), цепочечные структуры расположены вдоль направления [111]

Таблица 1.1. Кристаллографические данные для двух безводных (Т и М) и одной гидратной формы (Н) диосквида\*

Кристаллическая полиморфная форма	Т	М	Н
Эмпирическая формула	$C_{10}H_{10}N_2O_4$	$C_{10}H_{10}N_2O_4$	$C_{10}H_{10}N_2O_4 \cdot 0,333H_2O$
Молекулярный вес	222,20	222,20	228,21
Кристаллическая система	triclinic	monoclinic	orthorhombic
Пространственная группа	$P - 1$	$P2_1/c$	$Pbca$
$a$ , Å	7,3194(7)	9,1709(9)	18,0035(15)
$b$ , Å	8,0774(8)	15,3486(14)	31,8369(19)
$c$ , Å	8,9872(8)	7,0367(7)	10,2555(12)
$\theta$ , deg	71,516(11)	90	90
$\beta$ , deg	70,815(9)	110,316(12)	90
$\theta$ , deg	79,317(12)	90	90

\* Для порошковых образцов, включающих формы М и Н, применен многофазный Ретвильд-метод.

Таблица 1.1 (окончание)

Кристаллическая полиморфная форма	Т	М	Н
$V, \text{ \AA}^3$	473,98(8)	928,87(16)	5878,2(9)
$M_{20}$	260	154	144
$F_{30}$	583 (0,0014, 38)	421 (0,0023, 43)	397 (0,0021, 68)
$Z$	2	4	24
Дифрактометр	ID22, ESRF	ID22, ESRF	ID22, ESRF
Длина волны излучения, $\text{ \AA}$	0,399996(3)	0,399996(3)	0,399996(3)
$\rho_{\text{рассч}}, \text{ г/см}^3$	1,557	1,589	1,547
$\mu, \text{ мм}^{-1}$	0,027	0,028	0,027
$2\theta_{\text{min}} - 2\theta_{\text{max}}, \text{ град}^*$	2,001–19,902	1,200–19,995	1,200–20,877
Число параметров	124/56	118/56	235/177
$R_p/R_{wp}/R_{exp}$	0,0316/0,0438/0,0168	0,0235/0,0317/0,0178	0,0243/0,0325/0,0165
Добротность	2,608	1,764	1,947

\* погрешность измерения

Сравнение кривых ДСК и ТГ исходного и криомодифицированного диоксида показывает различие в положении и величине эндотермического эффекта плавления, экзотермического эффекта разложения и потери массы [71]. Для исходной субстанции диоксида потеря адсорбированной воды составляет 0,83%, плавление происходит при температуре  $175,5 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  с тепловым эффектом  $-99,8 \pm 0,4 \text{ Дж/г}$ , а термолит протекает при температуре  $199,2 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  с тепловым эффектом  $1135 \pm 4 \text{ Дж/г}$  и потерей массы 51,48%. Для новой формы диоксида, полученной методом сублимационной сушки, потеря физически адсорбированной воды составляет 2,72%, плавление происходит при температуре  $171,7 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  с тепловым эффектом  $-38,8 \pm 0,4 \text{ Дж/г}$ , а термолит протекает при температуре  $186,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  с тепловым эффектом  $(1243 \pm 4) \text{ Дж/г}$  и потерей массы 24,92%. Для диоксида, модифицированного методом сублимации-низкотемпературной конденсации, пик плавления различим плохо, а термолит наблюдается при  $163 \text{ }^\circ\text{C}$  с тепловым эффектом  $1211 \text{ Дж/г}$  и потерей массы 43,21%

На рис 1.14 представлены ИК-спектры исходного диоксида, диоксида модифицированного методом сублимационной сушки, и сублимации — низкотемпературной конденсации.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в результате криомодификации происходит образование новых форм диоксида, различающиеся конформацией молекул диоксида и системой водородных

связей, стабилизирующих метастабильные и стабильные кристаллические структуры [72]. В случае фармакопейного диоксидина полоса колебания хиноксалинового кольца находится при  $1506\text{ см}^{-1}$ , а полосы колебаний С-Н ароматического кольца проявляются пиком при  $971\text{ см}^{-1}$  и двумя дублетами при  $1117$  и  $1113$ ,  $1152$  и  $1160\text{ см}^{-1}$ , полоса колебаний С-О-Н также дублетная при  $1280$  и  $1288\text{ см}^{-1}$ . В случае диоксидина, криомодифицированного методом сублимационной сушки, полоса колебания хиноксалинового кольца находится при  $1510\text{ см}^{-1}$ , полосы колебаний С-Н бензольного кольца проявляются при  $975$ ,  $113$ ,  $1160\text{ см}^{-1}$ , а полоса колебаний С-О-Н проявляется при  $1288\text{ см}^{-1}$ . ИК-спектры диоксидина, криомодифицированного методом сублимации — низкотемпературной конденсации, отличаются от диоксидина, модифицированного методом сублимационной сушки, полосой колебаний связей С-О ( $2236\text{ см}^{-1}$ ) молекулы  $\text{CO}_2$ .

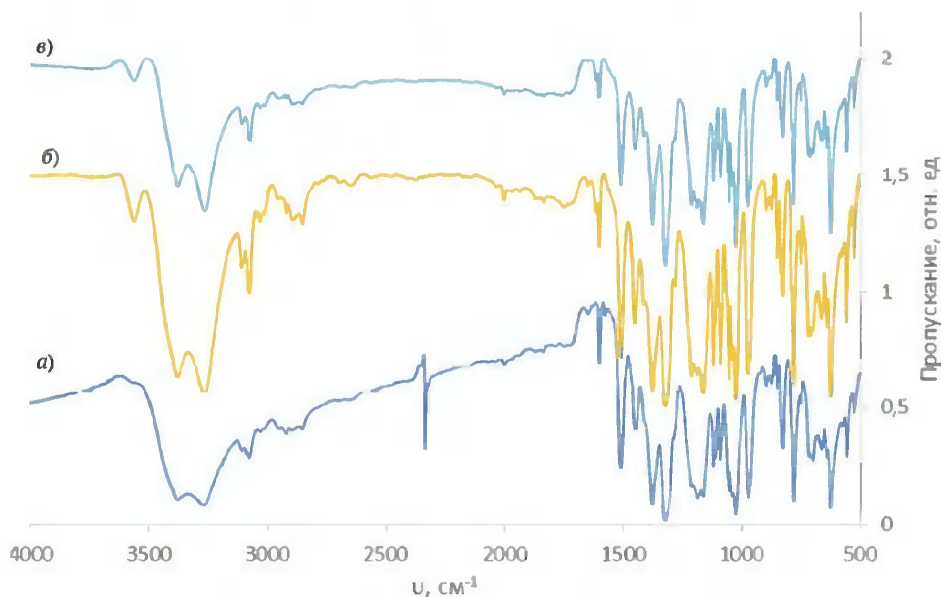
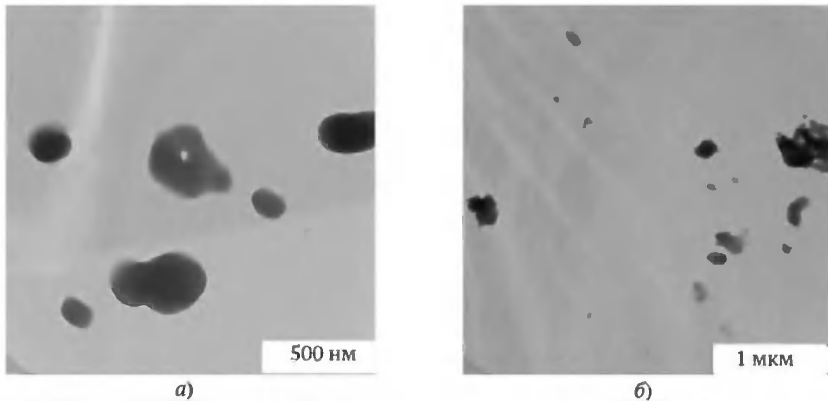


Рис. 1.14. ИК-спектры исходного фармакопейного (а), модифицированного методом сублимационной сушки (б) и методом сублимации — низкотемпературной конденсации (в) диоксидина

Методом низкотемпературной адсорбции аргона была определена удельная поверхность и рассчитан средний размер частиц исходного ( $0,7\text{ м}^2/\text{г}$ ,  $5700\text{ нм}$ ) и криомодифицированного методом сублимационной сушки ( $21,3\text{ м}^2/\text{г}$ ,  $190\text{ нм}$ ) и методом сублимации — низкотемпературной конденсации ( $47\text{ м}^2/\text{г}$ ,  $85\text{ нм}$ ) диоксидина. Уменьшение размера частиц лекарственного препарата в ходе криомодификации подтверждают микрофотографии, полученные методом ПЭМ (рис. 1.15).



**Рис. 1.15.** Микрофотографии ПЭМ, модифицированного методом сублимационной сушки (а) и методом сублимации — низкотемпературной конденсации (б) диоксидина

Можно сделать вывод, что размер частиц диоксидина, полученного методом сублимационной сушки составляет 50–300 нм (средний размер — 170 нм), полученного сублимацией — низкотемпературной конденсацией составляет 20–400 нм (средний размер — 78 нм).

Данные по кинетике растворения разных форм диоксидина получали спектрофотометрически [75]. Исходный диоксидин (рис. 1.16) растворяется за 200–300 с, в то время как диоксидин, модифицированный методом сублимационной сушки, полностью растворяется за 30 с, а диоксидин модифицированный методом испарения-низкотемпературной конденсации за 80 с. Таким образом, криомодифицированные формы диоксидина обладают значительно лучшей способностью к растворению, чем исходный фармакопейный диоксидин.

Диоксидин, полученный методом сублимационной сушки, был активен по отношению к *E. coli* 52, *S. aureus* 144, *M. cyanum* 98, *B. cereus* 9 (табл. 1.2.). Через 48 часов инкубации антибактериальная активность криомодифицированного методом сублимационной сушки препарата была выше для всех изучаемых штаммов бактерий.

**Таблица 1.2.** Диаметры зон задержки роста *E. coli* 52, *S. aureus* 144, *M. cyanum* 98, *B. cereus* 9 вокруг таблеток исходного фармакопейного и криомодифицированного диоксидина через 48 часов инкубации

Используемые штаммы бактерий	Диаметр зон задержки роста вокруг таблеток исходного диоксидина, мм	Диаметр зон задержки роста вокруг таблеток криодиоксидина, мм
<i>E. coli</i> 52	33,3 ± 0,6	37,7 ± 1,0
<i>S. aureus</i> 144	19,7 ± 1,2	29,7 ± 1,2
<i>M. cyanum</i> 98	25,3 ± 1,2	36,0 ± 0,6
<i>B. cereus</i> 9	29,3 ± 1,0	31,0 ± 1,2

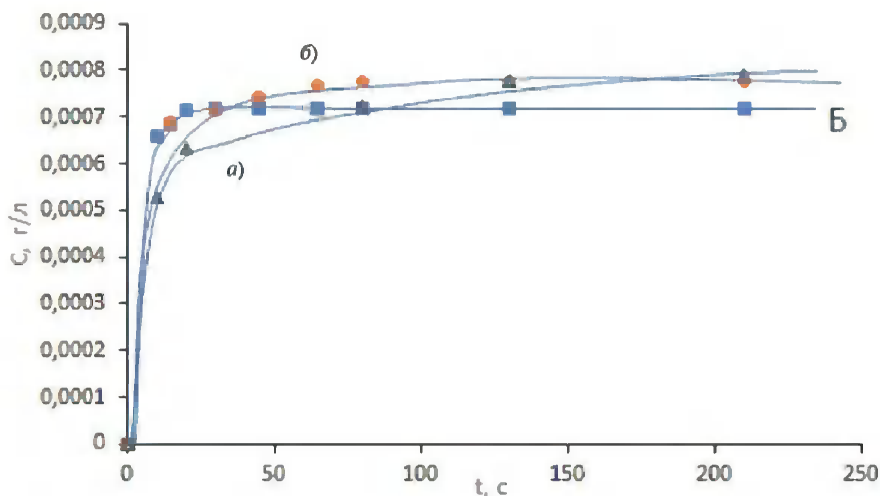


Рис. 1.16. Кинетические кривые растворения исходного фармакопейного (а), модифицированного методом сублимационной сушки (б) и методом сублимации — низкотемпературной конденсации (в) диоксидина

## 1.7. Гентамицин сульфат

Гентамицин сульфат (см. рис. 1.17) является природным антибиотиком, производимым растением *Microspora purpurea* [74]. В отличие от ранее рассмотренного диоксидина криохимическая модификация природного антибиотика гентамицина сульфата позволяет изменить размер его частиц, но не кристаллическую структуру.

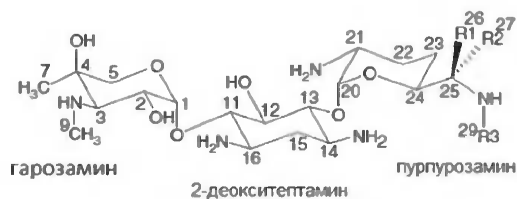


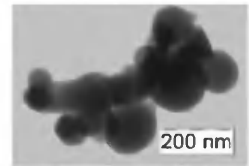
Рис. 1.17. Структурная формула производных гентамицина

		R1	R2	R3
1	Гентамицин С1	-CH <sub>3</sub>	-H	-CH <sub>3</sub>
2	Гентамицин С1а	-H	-H	-H
3	Гентамицин С2	-CH <sub>3</sub>	-H	-H
4	Гентамицин С2а	-H	-CH <sub>3</sub>	-H
5	Гентамицин С2b	-H	-H	-CH <sub>3</sub>

Исходную субстанцию гентамицина сульфата подвергли криохимической модификации с использованием сублимационной сушки замороженного раствора. Субстанцию гентамицина сульфата, соответствующую фармакопейной статье (ФС) 42-2626-89, использовали без дополнительной очистки. В колбу с 50 мл дистиллированной воды добавили 0,5 г порошка гентамицина сульфата. Полученный раствор при перемешивании нагрели до кипения, распылили через пневматическую форсунку в жидкий азот ( $T_{\text{кип}} = -195,8 \text{ }^\circ\text{C}$ , скорость замораживания 60 град/мин) и подвергли лиофильной сушке в течение 24 часов [71, 75].

ЯМР  $^1\text{H}$  спектры криомодифицированного методом сублимационной сушки гентамицина сульфата соответствовали литературным данным [72]. ИК-спектры исходного и криомодифицированного гентамицина сульфата были идентичны. Как исходный фармакопейный гентамицина сульфат, так и криомодифицированный препарат были рентгеноаморфны. Однако удельная поверхность и рассчитанный на ее основании средний размер частиц для исходного фармакопейного ( $1,6 \text{ м}^2/\text{г}$ , 2884 нм) и криомодифицированного ( $42 \text{ м}^2/\text{г}$ , 110 нм) гентамицина сульфата оказались различны. Высокую дисперсность полученного порошка гентамицина сульфата подтверждают и микрофотографии ПЭМ (рис. 1.18), исходя из которых можно заключить, что криохимическая модификация по методу лиофильной сушки приводит к формированию наночастиц гентамицина сульфата размером 50–350 нм.

Рис. 1.18. Микрофотография ПЭМ криомодифицированного методом сублимационной сушки гентамицина сульфата



Данные биологического тестирования полученных криомодифицированных образцов гентамицина сульфата — зоны подавления роста бактериальных клеток *S. aureus* 244 после 24 часов инкубирования (табл. 1.3) показывают небольшое увеличение антибактериальной активности криомодифицированного образца по сравнению с исходной фармацевтической субстанцией. Факт небольшого увеличения биологической активности вследствие криомодифицирования образца, может быть связан с тем, что в данном случае образец является рентгеноаморфным и новых кристаллических модификаций не было получено.

Таблица 1.3. Диаметры зон задержки роста, *S. aureus* 144 и *E. coli* 52, вокруг таблеток исходного фармакопейного и криомодифицированного гентамицинсульфата через 24 часа инкубации

Используемые штаммы бактерий	Диаметр зон задержки роста вокруг таблеток исходной субстанций, мм	Диаметр зон задержки роста вокруг таблеток криомодифицированного образца, мм
<i>E. coli</i> 52	28,0 ± 1,0	34,3 ± 1,0
<i>S. aureus</i> 144	15,3 ± 0,6	19,0 ± 0,6

## Заключение

В последнее время в современной медицине и фармацевтике много внимания уделяется развитию новых методов и получению наноразмерных форм и новых полиморфных модификаций известных лекарственных препаратов. Предлагаемые подходы не требуют длительных фармакологических и токсикологических испытаний. Поэтому актуальна задача разработки более эффективных лекарственных форм на основе известных фармацевтических субстанций, что позволяет окупить вложенные средства намного быстрее, чем поиск и тестирование абсолютно новых препаратов.

Методы криохимического синтеза и криохимической модификации позволяют микронизировать различные лекарственные субстанции и получать метастабильные кристаллические структуры порошков различных лекарственных препаратов. Уменьшение размера частиц лекарственных веществ вплоть до наноуровня приводит к увеличению общей площади поверхности модифицированных образцов. При этом такие физико-химические свойства, как скорость растворения, растворимость насыщения, морфология, энергия поверхности, могут изменяться, что в свою очередь может приводить к изменению терапевтических свойств криохимически модифицированных лекарственных препаратов и терапевтических композиций на их основе. В ряде случаев можно ожидать снижения нежелательных побочных воздействий и токсичности лекарственных препаратов. Особенно сильных эффектов можно ожидать при получении полиморфных кристаллических модификаций в наноразмерных формах лекарственных препаратов.

Перспективы развития криохимических подходов к получению наноформ лекарственных препаратов с высокой терапевтической эффективностью и биодоступностью связаны с разработкой эффективных методов стабилизации морфологических, физико-химических и терапевтических свойств во времени и созданием новых методов введения таких форм препаратов в живые организмы. Это позволит перейти к индивидуальному



подходу к определению терапевтической дозы более эффективных лекарственных препаратов и композиций на их основе и персонализированной медицине XXI века.

Авторы благодарят доктора биол. наук А.М. Семенова и магистранта Д.Н. Хватова (Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) и доктора хим. наук проф. В.В. Чернышева (Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) за участие в проводимых исследованиях, Российский фонд фундаментальных исследований (РФФИ 15-08-05178а, РФФИ-09-03-13557-офи-ц) за финансовую поддержку работ. Работа по диоксидину и гентамицину сульфату выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект РНФ № 16-13-10365).

## Авторы

**Шабатин Владимир Петрович**, к.х.н., старший научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Криохимический синтез и анализ материалов со специальными свойствами, включая нанодисперсные металлы, керметы, оксиды, органические соединения, в том числе лекарственные субстанции, фитопрепараты, витаминные препараты, криомодифицирование органических соединений

**Морозов Юрий Николаевич**, к.х.н., старший научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Криохимический синтез органических соединений, в том числе лекарственные вещества, криомодифицирование лекарственных субстанций, жидкие и пластические кристаллы, термический анализ, ЭПР-спектроскопия.

**Верная Ольга Ивановна**, к.х.н., научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Физическая химия, химическая кинетика, катализ, фармакология, наночастицы металлов, гибридные и композитные материалы, лекарственные препараты, направленная доставка.

**Шабатина Татьяна Игоревна**, д.х.н., ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией химии низких температур МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Криохимия, химия наноразмерных кластеров и частиц металлов, гибридные наноматериалы, металломезогены, наноформы лекарственных веществ, наноструктурированные пленки.

## Литература

1. *Lee, E.H.* A Practical Guide to Pharmaceutical Polymorph Screening & Selection. — Asian J. Pharm. Sci., 2014, **9**, 163.
2. *Junyaprasert V.B., Morakul B.* Nanocrystals for Enhancement of Oral Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. — Asian J. Pharm. Sci., 2015, **10**, 13.
3. *Sarma B., Chen J., His, H.-Y., Myerson, A.S.* Solid Forms of Pharmaceuticals: Polymorphs, Salts and Cocrystals. — Korean J. Chem. Eng., 2011, **28**(2), 315–322
4. *Лампрехт А.* Нанолечения. Концепции доставки лекарств в нанонауке. — М.: Научный мир, 2010. — 231с.
5. *Liversidge G.G., Cundy K.C.* Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. — Int. J. Pharm., 1995, **125**, 91.
6. *Gao L., Liu G., Ma J., Wang X., Zhou L., Li X.* Drug nanocrystals: In vivo performances. — Journal of Controlled Release, 2012, **160**, 418.
7. *Liu F., Park J.Y., Zhang Y, Conwell C., Liu Y., Bathula S.R., Huang L.* Targeted cancer therapy with novel high drug-loading nanocrystals. — J. Pharm. Sci., 2010, **99**, 3542.
8. *DuBohm B.H., Muller R.H.* Lab-scale production unit design for nanosuspensions of sparingly soluble cytotoxic drugs. — Pharm. Sci. Technol. Today, 1999, **2**, 336.
9. *Verma S., R. Gokhale R., Burgess D.J.* A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. — Int. J. Pharm., 2009, **380**, 216.
10. *Liversidge E.M., Liversidge G.G., E.R. Cooper E.R.* Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. — Eur. J. Pharm. Sciences, 2003, **18**, 113.
11. *Rasenack N., Steckel H., Muller B.W.* Preparation of microcrystals by in situ micronization. — Powder Technology, 2004, **143**, 291.
12. *Keck C.M., Muller R.H.* Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization. — Eur. J. Pharm. Biopharm., 2006, **62**(1), 3.
13. *Nagare S., Senna M.* Reagglomeration mechanism of drug nanoparticles by pulsed laser deposition. — Solid State Ionics, 2004, **172**, 243.
14. *Muller R.H., Gohla S, Keck C.M.* State of the art of nanocrystals — special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. — Eur. J. Pharm. Biopharm., 2011, **78**, 1.
15. *Sun B., Yeo Y.* Nanocrystals for the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. — Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 2012, **16**, 295.
16. *Sarnes A., Kovalainen M. et al.* Nanocrystal-based per-oral itraconazole delivery: Superior in vitro dissolution enhancement versus Sporanox<sup>®</sup> is not realized in *in vivo* drug absorption. — J. Controlled Release, 2014, **180**, 109.
17. *Залепугин Д.Ю., Тилькуннова Н.А., Чернышова И.В.* Использование сверхкритических флюидов для получения нано- и микроформ фармацевтических субстанций. — Сверхкритические флюиды. Теория и практика, 2008, **3**, 5.
18. *Steckel H., Thies J., Muller B.W.* Micronizing of steroids for pulmonary delivery by supercritical carbon dioxide. — Int. J. Pharm., 1997, **152** (1) 99.
19. *Margulis-Goshen K., Netivi H.D., Major D.T., Gradzielski M., Raviv U., Magdassi S.* Formation of organic nanoparticles from volatile microemulsions. — J. Colloid Interface Sci., 2010, **342**, 283.
20. *Шабатин В.П., Можаяв А.П., Третьяков Ю.Д.* Успехи криохимической технологии в синтезе оксидных и композиционных материалов. — в Сб. «Химия низких температур и криохимическая технология». — М.: Изд-во МГУ, 1987, 19–36.

21. *Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S., Fessi H.* Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. — *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, **58**, 1688.
22. *Chen G., Wang W.* Role of freeze-drying in nanotechnology. — *Drying Technol.*, 2007, **25**, 29.
23. *Утехина А.Ю., Сергеев Г.Б.* Органические наночастицы — *Успехи Химии*, 2011, **80**, № 3, 233.
24. *Сергеев Г.Б., Комаров В.С., Шабатин В.П.* Способ получения порошков лекарственных препаратов. — Патент РФ № 2195264.от 05.02.2001.
25. *Комаров В.С., Михалев С.П., Морозов Ю.Н., Сергеев Г.Б.* Способ сублимации труднолетучих органических соединений. — Патент РФ № 229551.
26. *Морозов Ю.Н., Утехина А.Ю., Шабатин В.П., Чернышев В.В., Сергеев Г.Б.* Криосинтез и свойства наноразмерных лекарственных соединений. — *Журнал ВХО имени Д.И. Менделеева*, 2012, **56**(6), 43.
27. *Леонидов Н.Б., Шабатин В.П., Першин В.И., Савинова С.И., Серегина О.Б.* Физико-химические аспекты получения полиморфных модификаций лекарственных веществ. — *Журнал ВХО имени Д.И. Менделеева*, 1997, **41**(5), 37.
28. *Guranda D.T., Gil'deeva G.N.* Preparation of drug polymorphs (a review). — *Pharm. Chem. J.*, 2010, **44**(5), 254.
29. *Lee E.H.* A practical guide to pharmaceutical polymorph screening & selection. — *Asian J. Pharm. Sci.*, 2014, **9**(4), 163.
30. *Lawrence X. Yu, Scott M. R.A., Outlaw K.P.W., Nashed N.E., Ramos E., Miller S.P.F., Adams R.C., Fang F., Patel R.M., Holcombe F.O., Chiu Yu., Hussain A.S.* Scientific Considerations of Pharmaceutical Solid Polymorphism in Abbreviated New Drug Applications. — *Pharm. Res.*, 2003, **20**(4), 531.
31. ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism Chemistry, Manufacturing, and Controls Information. — U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2007 — 10 p.
32. *Inamdar N., Dhamecha L. D., Rath A., Saifee M.* Drug polymorphism. — *Intern. Journal of Health Research*, 2009, **2**, 291.
33. *Singhal D., Curatolo W.* Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. — *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, **56**(3), 335.
34. *Higashi K., Ueda K., Moribe K.* Recent progress of structural study of polymorphic pharmaceutical drugs. — *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2017, **117**, 71.
35. *Raza K., Kumar P., Ratan S., Malik R., Arora S.* Polymorphism: The Phenomenon Affecting the Performance of Drugs. — *Pharm. & Pharm. Sci.*, 2014, **1**(2), 10.
36. *Karpinski P.H.* Polymorphism of active pharmaceutical ingredients. — *Chem. Eng. Technol.*, 2006, **29** (2), 233.
37. *Li H., Kiang Y.H., Jona J.* Multiple approaches to pharmaceutical polymorphism investigation—a case study. — *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2009, **38**(5), 426.
38. *Spong R.B., Price C.P., Jayasankar A., Matzger A.J., Rodríguez-Hornedo N.* General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. — *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, **56**(3), 241.
39. *Yu L., Reutzel S.M., Stephenson G.A.* Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. — *Pharm. Sci. & Technol. Today*, 1998, **1**(3), 118.
40. *Lina A., Goodman J.M.* Polymorph control: past, present and future. — *Drug Discov. Today*, 2008, **13**, 198.
41. *Levi G., Procknal J.A.* Dissolution rate studies on methylprednisolone polymorphs. — *J. Pharm. Sci.*, 1964, **53**, 656.
42. *Moustafa M., Ebian A., Khalil S., Motawi M.* Sulphamethoxydiazine crystal forms. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1971, **23**(11), 868.

43. *Summers M.P., Enever R.P., Carless J.E.* The influence of crystal form on the radial stress transition characteristics of pharmaceutical materials. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1976, **28** (2), 89.
44. *Kato Y., Kohketsu M.* Relationship between polymorphism and bioavailability of amobarbital in the rabbit. — *Chem. Pharm. Bull.*, 1981, **29**(1), 268.
45. *Kimura K., Hirayama F., Uekama K.* Characterization of tolbutamide polymorphs (Burger's forms II and IV) and polymorphic transition behavior. — *J. Pharm. Sci.*, 1999, **88**(4), 385.
46. *Schmidt A.C., Senfter N., Griesser U.J.* Crystal polymorphism of local anaesthetic drugs. — *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2003, **73**, 397.
47. *Brittain H.G., Elder B.J., Isbester P.K., Salerno A.H.* Solid-State Fluorescence Studies of Some Polymorphs of Diflunisal. — *Pharm. Res.*, 2005, **22** (6), 999.
48. *Peltonen L., Hirvonen J.* Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods — *J. Pharm. Pharmacol.*, 2010, **62** (11), 1569.
49. *Комаров В.С., Морозов Ю.Н., Михалев С.П., Сергеев Б.М., Загорский В.В., Колотилов П.Н., Шабатин В.П., Артемьева М.М., Медведева Н.А., Медведев О.С., Сергеев Г.Б.* Способ получения рентгеноаморфной модификации карведилола. — Патент РФ № 2366653.
50. *Сергеев Б.М., Михалев С.П., Морозов Ю.Н., Шабатин В.П., Колотилов П.Н., Сергеев Г.Б.* Криомодификация лекарственных веществ: микронизированная аморфная форма карведилола — Вестник МГУ, Серия 2, Химия, 2010, **51**(6), 440.
51. *Whitnall M.H., Villa V., Seed T.M., Benjack J., Miner V., Lewbart M.L., Dowding C.A., Jackson W.* Molecular specificity of 5-androstenediol as a systemic radioprotectant in mice. — *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2005, **27**, 15.
52. *Утехина А.Ю., Москова А.В., Морозов Ю.Н., Колотилов П.Н., Сергеев Б.М., Сергеев Г.Б.* Получение и криомодификация физико-химических свойств наночастиц гормона — андростендиола-3 $\beta$ ,17 $\beta$ . — Булгеровские сообщения, 2011, **25**(6), 71.
53. *Середенин С.Б., Воронина Т.А., Незнамов Г.Г., Жердев В.П.* Феназепам: 25 лет в медицинской практике. — М.: Наука, 2007 — 384 с.
54. *Карапетян А.А., Андрианов В.Г., Стручков Ю.Т., Богатский А.В., Андронати С.А., Коротенко Т.И.* Кристаллическая и молекулярная структура 7-бром-5-(*o*-хлорфенил)-1,3-дигидро-2Н-1,4-бензодиазепин-2-она. — *Биоорганическая химия*, 1979, **5**, (11), 1684.
55. *Sergeev G.B., Sergeev B.M., Morosov Yu.N., Chernyshev V.V.* Beta-Polymorph of phenazepam: a powder study — *Acta Crystallographica, Section E*, 2010, **66**, O2623
56. *Морозов Ю.Н., Сергеев Б.М., Колотилов П.Н., Шабатин В.П., Сергеев Г.Б., Чернышев В.В., Воронина Т.А., Молодавкин Г.М.* Кристаллическая бета-модификация 7-бром-1,3-дигидро-5-(2-хлорфенил)-2Н-1,4-бензодиазепин-2-она и способ ее получения — Патент РФ № 2430094.
57. *Морозов Ю.Н., Колотилов П.Н., Шабатин В.П., Сергеев Г.Б., Чернышев В.В., Воронина Т.А., Молодавкин Г.М.* Композиция для инъекций на основе кристаллической бета-модификации 7-бром-1,3-дигидро-5-(2-хлорфенил)-2Н-1,4-бензодиазепин-2-она, обладающая транквилизирующим действием и способ ее получения — Патент РФ № 2440120.
58. *Морозов Ю.Н., Федоров В.В., Шабатин В.П., Верная О.И., Чернышев В.В., Абель А.С., Архангельский И.В., Шабатина Т.И., Сергеев Г.Б.* Криохимическая модификация лекарственных веществ: наноразмерная форма III пироксикама и ее физико-химические параметры. — Вестн. МГУ, Сер. 2. Химия, 2016, **57**(5), 315–320.
59. *Naelapää K., Van De Streek J., Rantanen J., D. Bond A.* Complementing High-Throughput X-ray Powder Diffraction Data with Quantum-Chemical Calculations: Application to Piroxicam Form III. — *J. Pharm. Science*, 2012, **101**(11), 4214.

60. Гончаров В.П., Кацяя Г.В. Гормон здоровья и долголетия. — М.: Адамант, 2012. — 160 с.
61. Chang L.-C., Caira C.M., Guillory J.K. Solid state characterization of dehydroepiandrosterone. — J. Pharm. Sci., 1995, **84**, 1169.
62. Caira M.R., Guillory J.K., Chang L.-C. Crystal and molecular structures of three modification of androgen dehydroepiandrosterone (DHEA). — J. Chem. Crystallogr., 1995, **25**, 393.
63. Bhacca N.S., Fronczek F.R., Sygula A.J. Investigation of dehydroepiandrosterone. Part I: crystal structure of sublimed DHEA. — Chem. Crystallogr., 1996, **26**, 483.
64. Stahly G.P., Bates S., Andres M.C., Cowans B.A. Discovery of a new polymorph of dehydroepiandrosterone (prasterone) and solution of its crystal structure from X-ray powder diffraction data. — Crystal Growth & Design, 2006, **6**(4), 925.
65. Морозов Ю.Н., Утехина А.Ю., Сергеев Г.Б., Чернышев В.В., Чистяков В.В., Гончаров Н.П., Ржезников В.М. Кристаллическая модификация 3 $\beta$ -гидрокси-5-андростен-17-она FVII и способ ее получения. — Патент РФ № 2528990.
66. Chernyshev V.V., Morozov Yu.N., Bushmarinov I.S., Makoed A.A., Sergeev G.B. New polymorph of dehydroepiandrosterone (DHEA) obtained via cryomodification — Crystal Growth and Design, 2016, **16**, 1088.
67. Morozov Yu., Chistyakov D., Chernyshev V., Sergeev G. Cryochemical Synthesis of Polymorphous Nanostructures of a Steroid Neurohormone — Molecules, 2017, **22**, 1378.
68. Падейская Е.Н. Антибактериальный препарат диоксидин: особенности биологического действия и значение в терапии различных форм гнойной инфекции — Хим.-фармацевт. ж., 1977, **11**(8), 139.
69. Шабатин В.П., Верная О.И. Семенов А.М., Шабатина Т.И. Кристаллическая  $\beta$  — модификация 2,3-бис-(гидроксиметил)хиноксалин-N,N'-диоксид, Метод получения и фармацевтическая композиция на его основе. — Патент RU2563256 от 11.04.2014.
70. Верная О.И., Шабатин В.П., Семенов А.М., Шабатина Т.И. Получение криохимически модифицированного ультрадисперсного порошка диоксидина и определение его антибактериальной активности. — Вестн. МГУ, Сер. 2. Химия, 2016, **57**(5), 307.
71. Верная О.И., Шабатин В.П., Шабатина Т.И., Хватов Д.И., Семенов А.М., Юдина Т.П., Данилов В.С. Криохимическая модификация диоксидина, его активность и токсичность. — Журн. физ. Химии, 2017, **91**(2), 230.
72. Shabatina T.I., Vernaya O.I., Shabatina V.P., Euseeva J.V., Melnikov M.Ya., Fitch A.N., Chernyshev V.V. Cryochemically obtained nanoforms of antimicrobial drug substance dioxidine and their physico-chemical and structural properties. — Crystals, 2018, **8**(7), 298.
73. Верная О.И., Шабатин В.П., Нуждина А.В., Звукова Н.Д., Хватов Д.И., Семенов А.М., Лозинский В.И., Шабатина Т.И., Мельников М.Я. Криохимический синтез и антибактериальная активность гибридных наноконструктов диоксидина с наночастицами Ag и Cu, включенных в биополимерные криооструктуры. — Известия Академии наук, Сер. химическая, 2017, **41**(11), 2152.
74. Deubner R., Schollmayer C., Wienen F., Holzgrabe U. Assignment of the major and minor components of gentamicin for evaluation of batches. — Magn. Reson. Chem., 2003, **41**, 589.
75. Шабатина Т.И., Верная О.И., Шабатин В.П., Нуждина А.В., Звукова Н.Д., Лозинский В.И., Мельников М.Я. Гибридные наносистемы на основе антибактериального препарата диоксидина и наночастиц металлов (Ag, Cu), включенные в биополимерные криооструктуры. — Российские нанотехнологии, 2018, **13**(3–4), 76.

## Глава 2

# Нанокompозиты антибиотик-биологически активный металл

*Верная О.И.<sup>1</sup>, Шабатина Т.И.<sup>1</sup>, Шабатин В.П.<sup>1</sup>, Семенов А.М.<sup>2</sup>, Мельников М.Я.<sup>1</sup>*

Антибиотики используются для уничтожения патогенных микроорганизмов, являющихся причиной широкого спектра заболеваний. Они внесли большой вклад в здоровье человека. Многие болезни, которые когда-то протекали с высоким летальным исходом, теперь можно эффективно лечить антибиотиками. Однако некоторые патогенные бактерии стали устойчивыми (резистентными) к часто используемым антибиотикам.

Резистентность к антибиотикам является серьезной проблемой общественного здравоохранения [1–16]. Ее можно было предотвратить за счет надлежащей гигиены, правильного использования назначенных антибиотиков, а также сведя к минимуму ненужное назначение и чрезмерное применение антибиотиков. Однако интенсивное использование антибиотиков в последние годы (100 000–200 000 тонн в год) привело к возрастанию частоты возникновения резистентности у патогенных микроорганизмов, что резко снижает эффективность лечения и увеличивает риск осложнений и летальных исходов. Так, в США в 2017 г. резистентные микроорганизмы послужили причиной 2 000 000 заболеваний и 23 000 смертей [17].

Для решения проблемы резистентности микроорганизмов в настоящее время используются следующие подходы [18]:

- Синтез новых антибиотиков и антибактериальных препаратов. Однако путь от синтеза препарата до появления его на полке аптеки занимает годы и десятилетия доклинических и клинических испытаний. А резистентность к антибактериальным препаратам возникает значительно быстрее.
- Использование нескольких антибиотиков одновременно. Однако в последние годы появились мультирезистентные патогенные микроорганизмы. Кроме того, при одновременном использовании двух и более

---

<sup>1</sup> Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет

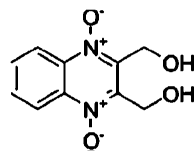
<sup>2</sup> Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет

антибиотиков возрастает не только эффективность препаратов, но и побочный эффект.

- Модификация имеющихся лекарственных препаратов с целью сокращения числа устойчивых к ним штаммов.

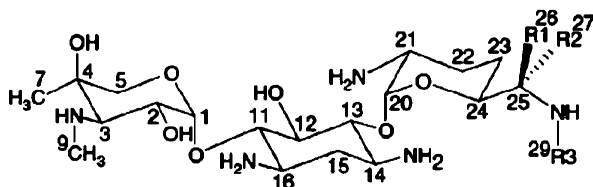
Одним из возможных вариантов модификации современных антибактериальных препаратов является использование их с наночастицами металлов, обладающих антибактериальной активностью. Наночастицы серебра и меди обладают не только высокой антибактериальной активностью, они активны в отношении штаммов патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам [19–23]. Научные публикации последних лет отмечают, что совместное использования наночастиц серебра, меди и антибактериальных препаратов приводит к синергическому эффекту взаимного усиления антибактериальной активности [24–39].

Целью настоящей работы являлся синтез гибридных нанокomпозитов на основе антибактериальных препаратов (диоксилина, гентамицина сульфата) и наночастиц металлов (серебра, меди), а также определение антибактериальной активности полученных гибридных лекарственных наночастиц в отношении бактериальных клеток.



2,3-бис-(Гидроксиметил)хиноксалин-N, N'-диоксид — диоксидин это синтетический антибактериальный препарат с выраженным бактерицидным типом действия. В основе действия этого препарата лежит нарушение биосинтеза ДНК микробной клетки с глубоким повреждением структуры нуклеотида на стадии внесения субингибирующих концентраций. Препарат эффективен в отношении широкого спектра штаммов бактерий [40].

Гентамицина сульфат это антибиотик группы аминогликозидов с широким спектром действия. Структурная формула основных компонентов гентамицина сульфата имеет вид



Антибиотик гентамицина сульфат продуцируется культурами гриба *Micromonospora purpurea* и является смесью гентамицинов (см. табл. 2.1) [41].

Механизм действия связан с ингибированием рибосомальных субъединиц 30S. Тесты *in vitro* подтверждают его активность относительно разных видов грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

Таблица 2.1. Функциональные группы к структурной формуле основных компонентов гентамицина сульфата

	$R_1$	$R_2$	$R_3$
Гентамицин С1	-CH <sub>3</sub>	-H	-CH <sub>3</sub>
Гентамицин С1а	-H	-H	-H
Гентамицин С2	-CH <sub>3</sub>	-H	-H
Гентамицин С2а	-H	-CH <sub>3</sub>	-H
Гентамицин С2b	-H	-H	-CH <sub>3</sub>

## 2.1. Криохимический синтез гибридных нанокomпозитов Ag (Cu)/диоксидин и Ag (Cu)/гентамицина сульфат

Субстанцию диоксидина, соответствующую фармакопейной статье 42-2308-97, субстанцию гентамицина сульфата, соответствующую фармакопейной статье 42-2626-89, коллоидное серебро марки КНД-С-К (ТУ 9154-024-74107096-2008), основной карбонат меди, муравьиную кислоту, хлорид меди II, гидразинагидрат квалификации «ЧДА» использовали без дополнительной очистки. Наночастицы меди получали восстановлением высокодисперсного безводного формиата меди водородом при 180 °С в течение 90 минут [42] и восстановлением водного раствора хлорида меди гидразинагидратом [43].

Гибридные нанокomпозиты диоксидина с наночастицами серебра (Ag/диоксидин) или меди (Cu/диоксидин), гибридные нанокomпозиты гентамицина сульфата с наночастицами серебра (Ag/гентамицина сульфат) получали распылением водного раствора, содержащего диоксидин (гентамицина сульфат) и наночастицы металла (1 масс.% антибактериального препарата, 0,005 масс.% Ag или 0,02 масс.% Cu), через пневматическую форсунку в жидкий азот, затем замороженные растворы подвергали криосублимационной сушке в течение 24 часов [37–39]. Для гибридных композитов Cu/диоксидин использовали наночастицы меди, полученные восстановлением безводного формиата меди водородом с размером частиц 5–50 нм, а для остальных медьсодержащих гибридных композитов использовали наночастицы меди, полученные восстановлением хлорида меди гидразинагидратом с размером частиц 1–9 нм.



## 2.2. Структурная и спектроскопическая характеристика образцов

Для установления химического состава полученных образцов они были охарактеризованы методами физико-химического анализа. Рентгенофазовый анализ (РФА) образцов проводили на дифрактометре Rigaku D/MAX-2500 (Rigaku, Япония) на  $\text{CuK}\alpha$  излучении ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ). ИК-спектры образцов получали в интервале  $4000\text{--}400 \text{ см}^{-1}$  на спектрометре Bruker Tensor II (Германия) с приставкой ATR platinum. Регистрацию ИК-спектров порошкообразных образцов осуществляли по методике диффузного отражения. УФ-спектры водных растворов образцов снимали на спектрофотометре Jasco V-770 (Jasco, Япония) в интервале  $200\text{--}700 \text{ нм}$ .

**Таблица 2.2.** ЯМР- $^1\text{H}$  спектры ( $\text{D}_2\text{O}$ ) гибридных композитов гентамицина сульфата наночастицами серебра

Номер атома углерода (рис.2), связанный с атомом (-ами) водорода	$\delta$
1	5,08; <i>d</i>
2	3,78; <i>dd</i>
3	2,57; <i>d</i>
5	4,04; <i>d</i>
5 <i>b</i>	3,31; <i>d</i>
7	1,20; <i>s</i>
9	2,50; <i>s</i>
11/13	3,25; <i>t/3,30; t</i>
12	3,57; <i>t</i>
14/16	2,77-2,96; <i>m</i>
15 <i>eq</i>	1,96; <i>dt</i>
15 <i>ax</i>	1,17 – 1,29; <i>m</i>
20	5,14; <i>d</i>
21	2,81; <i>dd</i>
22 <i>eq/22ax</i>	1,55 – 1,83; <i>m</i>
23 <i>eq/23ax</i>	1,40 – 1,68; <i>m</i>
24	3,73 – 3,90; <i>m</i>
25	2,67; <i>dd</i>
26	1,05; <i>d</i>
27	1,04; <i>d</i>
29	2,32; <i>s</i>

ЯМР- $^1\text{H}$ -гибридных нанокомпозитов диоксида с наночастицами металлов ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 5.11, *m*,  $\text{CH}_2(4)$ ; 7.92, *m*,  $\text{H Ar}(2)$ ; 8.39, *m*,  $\text{H Ar}(2)$  соответствуют диоксиду [18]. ЯМР- $^1\text{H}$  — гибридных нанокомпозитов

гентамицина сульфата с наночастицами серебра (табл. 2.2) соответствуют гентамицину сульфату [10].

УФ-спектры водных растворов композитов Ag/диоксидин и Cu/диоксидин, соответствовали диоксидину, в спектрах которого присутствует высокоинтенсивная полоса поглощения при 250 нм (дублет 241 и 259 нм), относящаяся к  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходу электронов ароматической системы, и полоса низкой интенсивности при 375 нм, относящаяся к  $n \rightarrow \pi^*$ -переходу электронов атома азота. В случае композитов Ag/диоксидин и Ag/гентамицина сульфат при высоких содержаниях серебра в образце (4%) в области 405 нм присутствует слабое поглощение, вызванное поверхностным плазмонным резонансом наночастиц серебра. Низкая интенсивность данного поглощения, а также отсутствие в УФ-спектре водного раствора композитов Cu/диоксидин полосы, соответствующей плазмонному поглощению наночастиц меди, связаны с невысоким содержанием наночастиц металлов в образцах.

Для композитов Ag/диоксидин и Cu/диоксидин были получены рентгеновские дифрактограммы (рис. 2.1), которые, так же, как и рассчитанные на их основании межплоскостные расстояния (табл. 2.3, 2.4), соответствовали высокодисперсной кристаллической  $\beta$ -форме диоксидина [43, 44].

В рентгенограммах композитов с высоким содержанием металла (4%) дополнительно присутствовали пики, соответствующие серебру или меди. Образец Ag/гентамицина сульфат был рентгеноаморфен.

ИК-спектры порошков гибридных композитов Ag/диоксидин и Cu/диоксидин были идентичны ИК-спектру криомодифицированного диоксидина (рис. 2.2). В случае криомодифицированного диоксидина и композитов Ag/диоксидин и Cu/диоксидин полоса колебания хиноксалинового кольца находится при  $1510 \text{ см}^{-1}$ , полосы колебаний C-H бензольного кольца проявляются при  $974, 1113, 1160 \text{ см}^{-1}$ , а полоса колебаний C-O-H проявляется при  $1288 \text{ см}^{-1}$ . В то время как в случае фармакопейного диоксидина полоса колебания хиноксалинового кольца находится при  $1506 \text{ см}^{-1}$ , а полосы колебаний C-H ароматического кольца проявляются пиком при  $971 \text{ см}^{-1}$  и двумя дублетами при  $1117$  и  $1113, 1152$  и  $1160 \text{ см}^{-1}$ , полоса колебаний C-O-H также дублетная при  $1280$  и  $1288 \text{ см}^{-1}$ .

ИК-спектр композитов Ag/гентамицина сульфат (рис. 2.3) незначительно отличался от спектра исходного фармакопейного гентамицина сульфата, полосой, соответствующей колебаниям  $\text{HSO}_4$  и C-O, которая при переходе от гентамицина сульфата к его гибридным композитам с наночастицами серебра и меди сдвигалась с  $1040$  до  $1056 \text{ см}^{-1}$ .

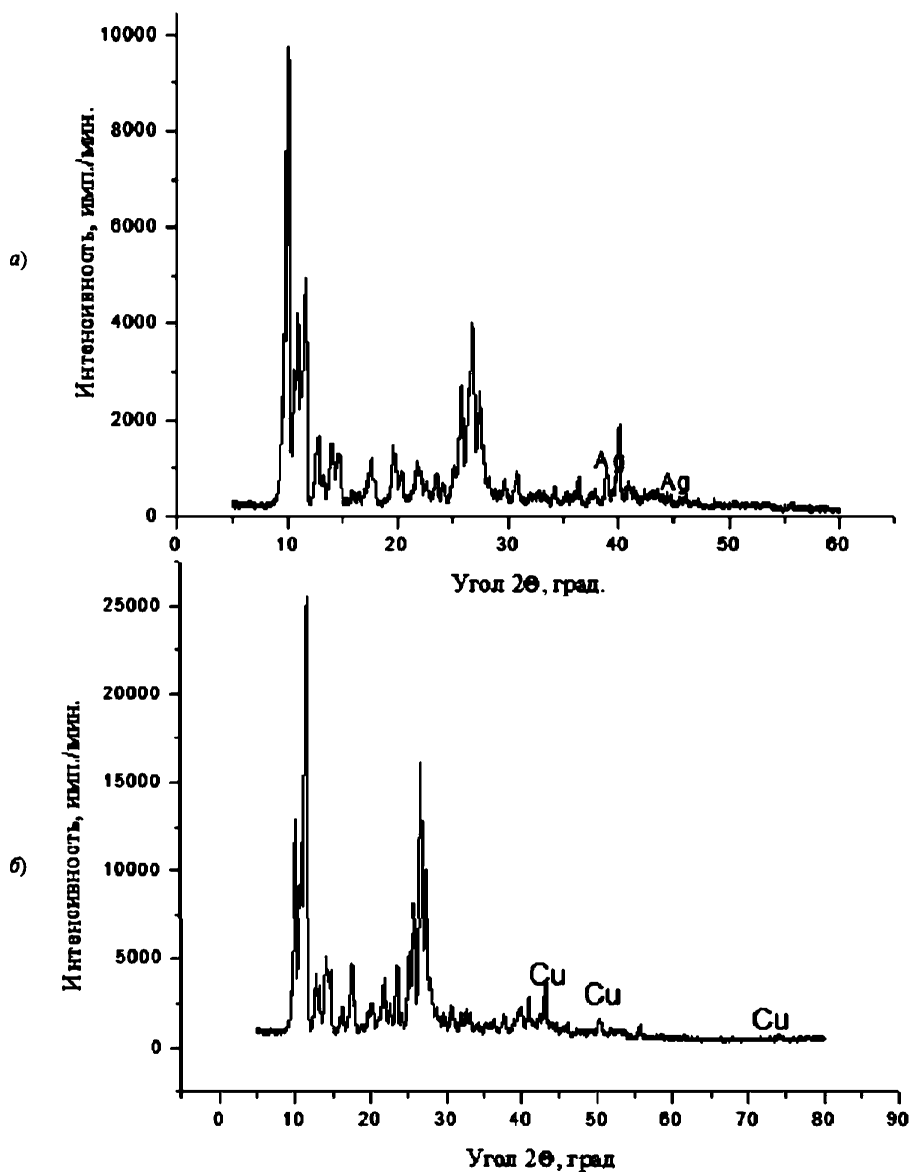


Рис. 2.1. Рентгеновские дифрактограммы гибридных композитов Ag/диоксидин (а) и Cu/диоксидин (б)

Микроструктуру образцов изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на электронном микроскопе Hitachi HT7700 (Hitachi, Япония) при увеличениях  $\times 40$ -600000, на электронном микроскопе LEO 912 AB Omega (ZEISS, Germany) при увеличениях  $\times 80$ -500000 и ме-

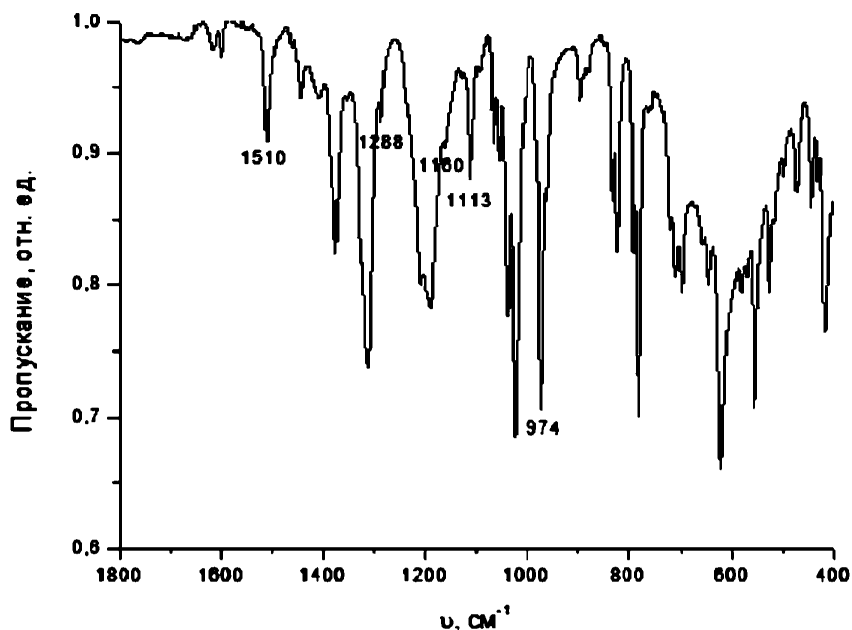


Рис. 2.2. ИК-спектр криомодифицированного диоксидина и композитов Ag/диоксидин и Cu/диоксидин

Таблица 2.3. Углы  $2\theta$ , межплоскостные расстояния ( $d$ , Å) и их интенсивности ( $I_{отн}$ , %) образца 1% Ag/диоксидин

№ п/п	Угол $2\theta$	$d$ , Å	$I_{отн}$ , %	№ п/п	Угол $2\theta$	$d$ , Å	$I_{отн}$ , %
1	10,08	8,740	100,0	19	25,8	3,440	30,0
2	10,98	8,026	94,2	20	26,44	3,358	99,3
3	11,68	7,546	22,3	21	26,88	3,304	67,6
4	12,78	6,899	57,8	22	27,72	3,206	31,6
5	13,20	6,681	24,4	23	28,26	3,145	18,3
6	14,06	6,288	50,9	24	29,86	2,981	11,4
7	14,76	5,978	43,4	25	30,82	2,890	12,9
8	15,42	5,723	9,7	26	31,92	2,793	9,7
9	16,44	5,371	11,5	27	33,34	2,677	7,5
10	17,06	5,177	17,1	28	34,18	2,613	9,8
11	17,84	4,952	29,5	29	35,26	2,535	8,9
12	19,66	4,498	19,4	30	36,22	2,470	8,1
13	20,36	4,345	23,9	31*	38,06	2,36352	9,9
14	21,74	4,072	25,3	32	39,24	2,287	7,5
15	22,06	4,013	17,6	33	40,02	2,244	9,0

Таблица 2.3 (окончание)

№ п/п	Угол 2 $\Theta$	$d$ , Å	$I_{\text{отн}}$ , %	№ п/п	Угол 2 $\Theta$	$d$ , Å	$I_{\text{отн}}$ , %
16	22,68	3,905	20,5	34*	44,26	2,04574	7,1
17	24,10	3,678	28,4	35	46,06	1,963	6,7
18	25,16	3,526	12,7	36	53,62	1,703	7,0

\* межплоскостные расстояния, относящиеся к наночастицам серебра

Таблица 2.4. Углы 2 $\Theta$ , межплоскостные расстояния ( $d$ , Å) и их интенсивности ( $I_{\text{отн}}$ , %) образца 2% Cu/диоксидин

№ п/п	Угол 2 $\Theta$	$d$ , Å	$I_{\text{отн}}$ , %	№ п/п	Угол 2 $\Theta$	$d$ , Å	$I_{\text{отн}}$ , %
1	10,10	8,76	28,3	15	26,76	3,33	59,2
2	10,64	8,31	36,0	16	27,42	3,25	33,1
3	11,66	7,59	100,0	17	28,74	3,10	1,0
4	12,78	6,899	57,8	18	28,74	3,10	1,1
5	13,24	6,68	21,2	19	29,78	2,915	1,1
6	14,18	6,24	17,5	20	30,08	2,90	1,0
7	14,44	6,13	21,1	21	37,76	2,25	1,0
8	15,42	5,723	3,7	22	39,98	2,20	3,3
9	17,06	5,177	7,3	23	40,92	2,20	4,2
10	17,56	5,05	23,1	24*	43,27	2,09	8,2
11	20,14	4,41	11,2	25	50,4	1,81	5,1
12	21,86	4,07	5,1	36*	55,64	1,73	4,1
13	25,08	3,54	13,1	27*	74,08	1,28	0,8
14	25,68	3,46	25,3	32			

\* межплоскостные расстояния, относящиеся к наночастицам серебра

тодом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на растровом электронном микроскопе Phenom (FEI Company, Германия) при увеличениях  $\times 20$ –4000. Определение удельной поверхности ( $S_{\text{уд}}$ ) образцов проводили методом низкотемпературной адсорбции – тепловой десорбции аргона на лабораторной установке на базе хроматографа Хром 5. Предварительно адсорбированные газы удалялись с поверхности образцов на вакуумной установке. Средний размер частиц ( $a$ ) диоксида рассчитывали по формуле:  $a = 6/(\rho S_{\text{уд}})$  где  $\rho$  – плотность диоксида.

Согласно данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). наноконпозиты Ag/диоксидин Cu/диоксидин, Ag/гентамицина сульфат (рис. 2.4) состоит из органических частиц (размером 50–350 нм), внутри которых включены наноразмерные частицы серебра (со средним размером 10 нм) или Cu (размером 18 нм).

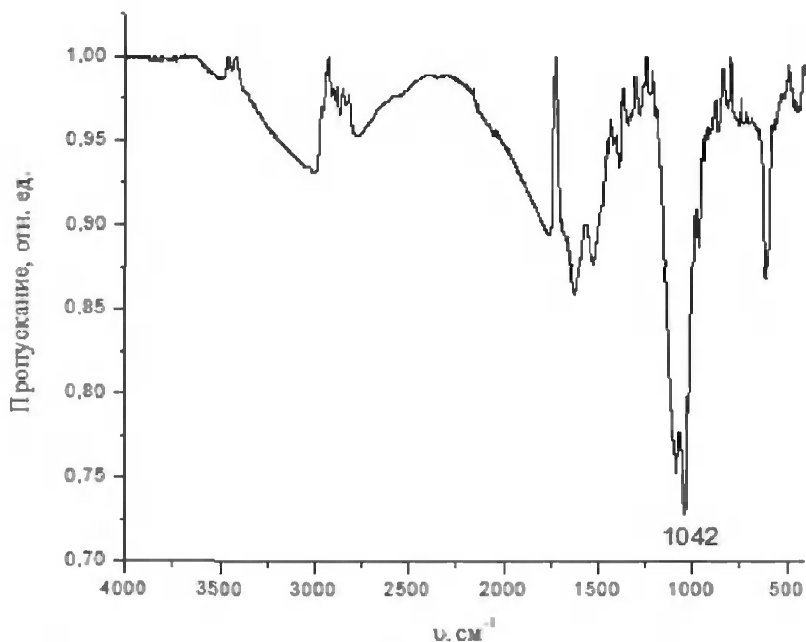


Рис. 2.3. ИК-спектр композитов Ag/гентамицина сульфат

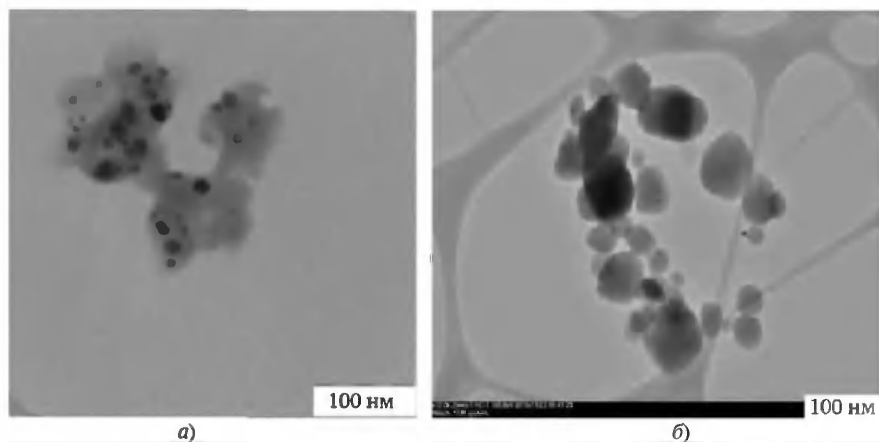


Рис. 2.4. Микрофотографии ПЭМ гибридных композитов Ag/диоксидин (а) и Ag/гентамицина сульфат (б)

Удельная поверхность и рассчитанный на ее основании средний размер частиц для композитов Ag/диоксидин составили  $31 \text{ м}^2/\text{г}$  и  $130 \text{ нм}$ , соответственно, для композитов Си/диоксидин  $24 \text{ м}^2/\text{г}$  и  $166 \text{ нм}$ , для композитов Ag/гентамицина сульфат  $38 \text{ м}^2/\text{г}$  и  $120 \text{ нм}$ . Более достоверными, вероят-

но, являются данные по низкотемпературной адсорбции аргона, так как на микрофотографиях, полученных методом ПЭМ, видны частицы диоксида и гентамицина сульфата, частично расплавившиеся под воздействием электронного пучка (несмотря на то, что использовался низкоэнергетический вариант метода).

## 2.3. Определение антибактериальной активности образцов

Определение антибактериальной активности различных форм диоксида и гибридных нанокомпозитов Ag/диоксидин, Cu/диоксидин, Ag/гентамицина сульфат, Cu/гентамицина сульфат в сравнении с исходным диоксидом, гентамицина сульфатом и растворами коллоидного серебра и меди осуществляли диско-диффузионным методом [14], с использованием дисков фильтровальной бумаги марки «красная лента» (диаметром 5 мм). В качестве тест-культур использовали бактериальные клетки, полученные из коллекции бактериальных культур кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: *E. coli* 52, *S. aureus* 144 и *M. cyaneum* 98. *B. cereus* 9, *P. aeruginosa* 47. Эксперименты проводили в чашках Петри, содержащих 20 мл агаризованной питательной среды, подсушенной в течение суток (толщина слоя среды 4 мм). Измерение зон задержки роста (ЗЗР) тест-культур проводили через 16 часов инкубации. Статистически достоверные результаты получали девятикратным повторением измерений ЗЗР для каждой серии образцов.

Антибактериальная активность диоксида, наночастиц серебра, меди и их гибридных композитов была определена в отношении микробных клеток *E. coli* 52, *S. aureus* 144 и *M. cyaneum* 98. *B. cereus* 9, *P. aeruginosa* 47. Полученные данные обобщены в табл. 2.5, 2.6.

**Таблица 2.5.** ЗЗР бактериальных штаммов вокруг дисков фильтровальной бумаги, пропитанных водными растворами\* образцов на основе диоксида

Бактериальный штамм	ЗЗР, Ag, мм	ЗЗР, Cu, мм	ЗЗР, диоксидин, мм	ЗЗР, Ag/диоксидин, мм	ЗЗР, Cu/диоксидин, мм
<i>E. coli</i> 52	0	0	26,2 ± 1,2	36,7 ± 0,6	32,1 ± 1,2
<i>S. aureus</i> 144	0	0	30,3 ± 0,6	37,1 ± 0,6	33,3 ± 1,2
<i>M. cyaneum</i> 98	0	0	26,2 ± 0,8	36,3 ± 0,6	31,1 ± 0,8
<i>B. cereus</i> 9	0	0	10,3 ± 0,8	13,4 ± 0,6	13,1 ± 0,6
<i>P. aeruginosa</i> 47	0	0	35,0 ± 0,6	41,2 ± 1,2	36,3 ± 0,8

\* диоксидин — 0,3 масс.%, Ag — 0,0015 масс.%, Cu — 0,006 масс.%.

**Таблица 2.6.** ЗЗР бактериальных штаммов вокруг дисков фильтровальной бумаги, пропитанных водными растворами\* образцов на основе гентамицина сульфата

Бактериальный штамм	ЗЗР, Ag, мм	ЗЗР, Cu, мм	ЗЗР, диоксидин, мм	ЗЗР, Ag/диоксидин, мм	ЗЗР, Cu/диоксидин, мм
<i>E. coli</i> 52	0	0	33,8 ± 0,8	36,5 ± 0,6	35,0 ± 0,8
<i>S. aureus</i> 144	0	0	18,0 ± 0,6	21,1 ± 0,6	20,2 ± 0,6

\* диоксидин – 0,3 масс.%, Ag – 0,0015 масс.%, Cu – 0,006 масс.%.

Антибактериальная активность гибридных композитов диоксидина с наночастицами металлов оказалась выше, чем индивидуальных наночастиц металлов и диоксидина для всех бактериальных штаммов, возрастала в следующей последовательности ЗЗР наночастиц серебра и меди < ЗЗР диоксидин < ЗЗР Cu/диоксидин < ЗЗР Ag/диоксидин. Для систем на основе гентамицина сульфата наблюдалась аналогичная закономерность.

Антибактериальная активность образцов в отношении *E. coli* 52 и *S. aureus* 144 возрастала в следующей последовательности: ЗЗР наночастиц металлов < ЗЗР гентамицина сульфата < ЗЗР Cu/гентамицина сульфата < ЗЗР Ag/гентамицина сульфата. Несмотря на то, что содержание серебра в гибридных композитах в 4 раза меньше, чем меди, более высокая активность систем Ag/антибактериальный препарат по сравнению с Cu/антибактериальный препарат, вероятно, связана с более высокой активностью наночастиц серебра в отношении бактериальных штаммов, которая пропорционально возрастает при переходе к системам металл/антибактериальный препарат.

## Заключение

Методом криохимического синтеза получены новые гибридные наноформы на основе антибактериальных препаратов диоксидина и гентамицина сульфата представляющие собой наночастицы лекарственного препарата размером 50–350 нм, содержащие наноразмерные частицы (со средним размером 5–18 нм) биологически активных металлов (серебро, медь). Гибридные наносистемы, синтезированные в данной работе, показали более высокую активность в отношении *E. coli* 52, *S. aureus* 144 и *M. cyanus* 98. *B. cereus* 9, *P. aeruginosa* 47 по сравнению с отдельными компонентами, что свидетельствует о наличии синергетических эффектов для гибридных нанокomпозитов, включающих одновременно антибактериальные препараты и наноразмерные частицы металлов.

На данный момент системы, близкие к полученным нами, известны для более дорогостоящих наночастиц золота, комплексы которых с боргидридом натрия и ампицилином/стрептомицином проявили более высокую



антибактериальную активность, чем ампицилин или стрептомицин [45]. Антибактериальная активность амоксициллина, нанесенного на наночастицы золота, выше, чем только антибиотика [46]. Антибактериальные препараты наносят на наночастицы магнетита, с целью их доставки методом магнитного нацеливания в пораженные органы [47, 48].

Полученные антибактериальные гибридные наноконпозиты могут быть использованы при создании новых лекарственных форм направленной доставки и регулируемого выделения лекарственных компонентов и служить достойными конкурентами аналогов, разрабатываемых в иностранных лабораториях.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 16-13-10365.

## **Авторы**

**Верная Ольга Ивановна**, к.х.н., научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Физическая химия, химическая кинетика, катализ, фармакология, наночастицы металлов, гибридные и композитные материалы, лекарственные препараты, направленная доставка.

**Шабатина Татьяна Игоревна**, д.х.н., ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией химии низких температур МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Криохимия, химия наноразмерных кластеров и частиц металлов, гибридные наноматериалы, металломезогены, наноформы лекарственных веществ, наноструктурированные пленки.

**Шабатин Владимир Петрович**, к.х.н., старший научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Криохимический синтез и анализ материалов со специальными свойствами, включая нанодисперсные металлы, керметы, оксиды, органические соединения, в том числе, лекарственные субстанции, фитопрепараты, криомодифицирование лекарственных соединений.

**Семенов Александр Михайлович**, д. биол. наук, ведущий научный сотрудник МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет. Микробиология, биологическое тестирование лекарственных препаратов, антибиотики

**Мельников Михаил Яковлевич**, д.х.н., профессор, заведующий кафедрой Химической кинетики, главный научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Реакции электронно-возбужденных радикалов и ион-радикалов; фотохимия, радиационная химия, кинетика химических реакций в твердой фазе, реакции интермедиатов на поверхности, катализ, фотохимия координационных соединений, фармакология, физическая органическая химия.

## Литература

1. *Levy S.B.* The challenge of antibiotic resistance. — *Scientific American*, 1998, **278**(3), 46.
2. *Levy S.B.* Antibiotic resistance — the problem intensifies. — *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**(10), 1446.
3. *Neu H.C.* The crisis in antibiotic resistance. — *Science*, 1992, **257**, 1064.
4. *Cornaglia G.* Fighting infections due to multidrug-resistant gram-positive pathogens. — *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, **15**, 209.
5. *Baiden F., Owusu-Agyei S., Webster J., Chandramohan D.* The need for new antibiotics. — *Lancet*, 2010, **375**, 637.
6. *Heddini A., Cars O., Qiang S., Tomson G.* Antibiotic resistance in China — a major future challenge. — *Lancet*, 2009, **373**, 30.
7. *Vento S., Cainelli F.* The need for new antibiotics. — *Lancet*, 2010, **375**, 637.
8. *Rice L.B.* The clinical consequences of antimicrobial resistance. — *Curr Opin Microbiol.*, 2009, **12**, 476.
9. *Nathan C., Cars O.* Antibiotic resistance — problems, progress, and prospects. — *N. Engl. J. Med.*, 2014, **371**, 1761.
10. *Calvin M., Kunin, M.D.* Antibiotic resistance — a world health problem we cannot ignore. — *Ann. Intern. Med.*, 1983, **99**(6), 859.
11. *Stuart B.* Antibiotic and antiseptic resistance: impact on public health. — *Pediat. Infect. Disease J.*, 2000, **19**(10), 120.
12. *Frieri M., Kumar K., Boutin A.* Antibiotic resistance. — *J. Inf. Publ. Health*, 2017, **10**(4), 369.
13. *Stefanaki C., Ieronymaki A., Matoula T., Caroni C., Polythodoraki E., Chryssou S.E., Kontochristopoulos G., Antoniou C.* Six-year retrospective review of hospital data on antimicrobial resistance profile of staphylococcus aureus isolated from skin infections from a single institution in Greece. — *Antibiotics*, 2017, **6**(4), 39.
14. *Dalhoff A.* Does the use of antifungal agents in agriculture and food foster polyene resistance development? A reason for concern. — *J. Glob. Antimicrob. Resistance*, 2018, **13**, 40.
15. *Akbar A., Farnia V.P., Hoffner S.* Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Epidemiology and role of morphological alterations. — *J. Glob. Antimicrob. Resistance*, 2018, **12**, 192.
16. *Cho S.Y., Kim H.M., Chung D.R., Kim S.H., Huh H.J., Kang C.I., Peck K.R., Lee N.Y., Song J.H.* Resistance mechanisms and clinical characteristics of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* isolates: A single-centre study in South Korea. — *J. Glob. Antimicrob. Resistance*, 2018, **12**, 44.
17. Antibiotic use in the United States, 2017: progress and opportunities. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2017.
18. *Silver L.L., Bostian K.A.* Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. — *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 1993, **37**(3), 377.
19. *Prakash P., Gnanaprakasama P., Emmanuela R., Arokijayarajb S., Saravanan M.* Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of *Mimusops*. — *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, 2013, **108**, 255.
20. *Necula B.S., Fratila-Apachitei L.E., Zaat S.A.J., Apachitei I., Duszczyk J.* In vitro antibacterial activity of porous TiO<sub>2</sub>-Ag composite layers against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. — *Acta Biomaterialia*, 2009, **5**, 3573.

21. Lara H.H., Ayala-Nunez N.V., Padila C.R. Silver nanoparticles — a material of the future — World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. P. 615–621.
22. Panacek A., Kutek L., Prucek R., Kolar M., Vecerova R., Pizurova N., Sharma V.K., Nevecna T., Zboril R. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. — J. Phys. Chem. B 2006. V. 110. P. 16248–16253.
23. Rai M., Yadav A., Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. // Biotechnol. Adv., 2009, **27**, 76.
24. Geoprincy G., Saravanan P., Nagendra Gandhi N., Renganathan S. Novel approach for studying the combined antimicrobial effects of silver nanoparticles and antibiotics through agar over layer method and disk diffusion method. — Dig. J. Nanomat. Biostruct., 2011, **6(4)**, 1557.
25. Naqvi Z.H.S., Kiran U., Ali M.I., Jamal A., Hameed A., Ahmed S., Ali N. Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. — Intern. J. Nanomed., 2013, **8**, 3187.
26. Gurunathan S. Biologically synthesized silver nanoparticles enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria. — J. Ind. Eng. Chem., 2015, **29**, 217.
27. Shahverdi A.R., Fakhimi A., Shahverdi H.R., Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. — Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med., 2007, **3**, 168.
28. Fayaz A.M., Balaji K., Girilal M., R. Yadav, P.T. Kalaichelvan, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. — Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med., 2010, **6**, 103.
29. Dar M.A., Ingle A., Rai M. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by Cryphonectria sp. evaluated singly and in combination with antibiotics. — Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med., 2013, **9**, 105.
30. Jyoti K., Baumthiyal M., Singh A. Characterization of silver nanoparticles synthesized using Urtica dioica Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. — J. Radiat. Res. Appl. Sci., 2016, **9(3)**, 217.
31. Hwang I., Hwang J.H., Choi H., Kim K.J., Lee D.G. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. — J. Med. Microbiol, 2012, **61**, 1719.
32. Kora A.J., Rastogi L. Enhancement of antibacterial activity of capped silver nanoparticles in combination with antibiotics, on model gram-negative and gram-positive bacteria. — Bioinorganic Chem. Appl., 2013, Article ID 871097.
33. Patil S.S., Dhumal R.S., Varghese M.V., Paradkar A. R., Khanna P. K. Synthesis and antibacterial studies of chloramphenicol loaded nano-silver against Salmonella typhi. — Synt. React. Inorg. Metal-Organ. Nano-Metal Chem., 2009, **39**, 65.
34. Moreira dos Santos M., Queiroz M. J., Baptista P.V. Enhancement of antibiotic effect via gold:silver-alloy nanoparticles. — J Nanopart. Res., 2012, **14**, 859.
35. Gu H., Ho P. L., Tong E., Wang L., Xu B. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. — Nano. Lett., 2003, **3(9)**, 1261.
36. Stepanauskas R., Glenn T.C., Jagoe C.H., Tuckfield R.C., Lindell A.H., King C.J., McArthur J.V. Coslection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. — Envir. Microbiol, 2006, **8(9)**, 1510.
37. Верная О.И., Хватов Д.И., Нуждина А.В., Федоров В.В., Шабатин В.П., Семенов А.М., Шабатина Т.И. Гибридные нанокompозиты Cu/диоксидин: криохимический синтез и антибактериальная активность. — Вестн. МГУ Сер. 2. Химия, 2017, **58(5)**, 271.

38. *Верная О.И., Шабатин В.П., Семенов А.М., Шабатина Т.И.* Криохимический синтез и антибактериальная активность нанокomпозитов серебра с диоксидином. — Вестн. МГУ Сер. 2. Химия, 2017, **57(6)**, 388.
39. *Верная О.И., Шабатин В.П., Нуждина А.В., Звукова Н.Д., Хватов Д.И., Семенов А.М., Лозинский В.И., Шабатина Т.И., Мельников М.Я.* Криохимический синтез и антибактериальная активность гибридных нанокomпозитов диоксида цинка с наночастицами Ag и Cu, включенных в биополимерные криоструктуры. — Известия Академии наук. Сер. Химическая, 2017, **11**, 2152.
40. *Падейская Е.Н.* Антибактериальный препарат диоксидин: особенности биологического действия и значение в терапии различных форм гнойной инфекции. — Инфекции и антимикробная терапия, 2001, **5**, 150.
41. *Altucci P., Sapiro U., Esposito E.* Gentamicin: antibacterial activity in vitro and clinical studies. — Chemotherapy, 1965, **10**, 312.
42. *Сайкова С.В., Воробьев С.А., Николаева Р.Б., Михлин Ю.Л.* Определение условий образования наночастиц меди при восстановлении ионов  $Cu^{2+}$  растворами гидрата гидразина. — Журн. общ. химии, 2010, **80(6)**, 952.
43. *Верная О.И., Шабатин В.П., Семенов А.М., Шабатина Т.И.* Получение криохимически модифицированного ультрадисперсного порошка диоксида цинка и определение его антибактериальной активности. — Вестн. МГУ Сер. 2. Химия, 2016, **57(5)**, 315.
44. *Верная О.И., Шабатин В.П., Шабатина Т.И., Хватов Д.И., Семенов А.М., Юдина Т.П., Данилов В.С.* Криохимическая модификация диоксида цинка, его активность и токсичность. — Журн. физ. химии, 2017, **91(2)**, 230.
45. *Bhattacharya D., Mukherjee A.* Gold Nanoparticles Conjugated Antibiotics: Stability and Functional Evaluation. — Nanoscience and Nanotechnology, 2012, **2(2)**, 14.
46. *Silvero J.C., Rocca D.M., de la Villarmois E.A., Fournier K., Lanterna A.E., Pérez M.F., Becerra M.C., Scaiano J.C.* Selective photoinduced antibacterial activity of amoxicillin-coated gold nanoparticles: from one-step synthesis to in vivo cytocompatibility. — ACS Omega, 2018, **3(1)**, 1220.
47. *Focanici Ciurlică E.L., Nadejde C., Creanga D.E., Carlescu A. A., Badescu V.* Antibiotic coated magnetite nanoparticles for biological applications. — Nanocon, 2010, 13.
48. *Grumezescu A.M., Gestal M.C., Holban A.M., Grumezescu V., Vasile B.Ş., Mogoantă L., Iordache F., Bleotu C., Mogosanu G.D.* Biocompatible  $Fe_3O_4$  increases the efficacy of amoxicillin delivery against gram-positive and gram-negative bacteria. — Molecules 2014, **19(4)**, 5013.

## Глава 3

# Принципы и методы криоструктурирования полимерных систем для создания инновационных материалов биомедицинского назначения

*Лозинский В.И.*<sup>1</sup>

Криоструктурирование полимерных систем — это группа процессов, обязательно включающих стадию замораживания исходно макроскопически бесструктурного раствора или коллоидной дисперсии соответствующих предшественников, что в результате, т. е. после инкубации в замороженном состоянии и далее оттаивания или удаления кристаллической фазы сублимацией либо криоэкстракцией, приводит к получению пространственно-структурированного полимерного материала, обладающего макропористой морфологией [1–17].

Эта глава посвящена одному из направлений криохимии полимеров — криогенному структурированию полимерных систем, регулярные научные исследования которого начались только в 70-х годах XX столетия, но тем не менее число запатентованных процессов и материалов уже превысило несколько сотен. В значительной степени это обусловлено тем, что такие материалы оказались востребованными для биомедицинских и биотехнологических приложений [2, 4–6, 11, 13, 16, 18–45]. Это, несомненно, относится и ко многим современным разработкам в области нанотехнологий, связанным с созданием гибридных наночастиц лекарственных веществ, биоактивных соединений и металлов, включенных в криогенно-структурированные биосовместимые полимерные матрицы [46–53] и предназначенных для использования в медицине, ветеринарии, в научных исследованиях. В этой связи основной целью излагаемых ниже разделов является демонстрация возможностей приемов криоструктурирования полимерных систем для получения новых материалов, главным образом тех их вариантов, которые могут найти применение или уже используются при решении задач биомедицинского профиля.

---

<sup>1</sup> Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Москва, 119334, ул. Вавилова, д. 28

### 3.1. Криогели и криоструктураты — что это такое, в чем сходство и каковы различия

Принципиальная схема формирования криогелей и криоструктуратов приведена на рис. 3.1 [1, 11, 54]. Общим этапом обоих процессов является замораживание исходного раствора предшественников, т. е. фазовый переход жидкое-твердое основной массы имеющегося в образце растворителя (образование льда в случае водных систем). Необходимо отметить, что соответствующий растворитель должен быть кристаллизующимся, но не стеклющимся. В этом аспекте обобщающим признаком процессов формирования и криогелей, и криоструктуратов является тип порообразователя, а именно, — поликристаллы низкомолекулярной жидкости, генерируемые *per se* при замораживании раствора предшественников. По завершении всех стадий криоструктурирования получают гетерофазные полимерные матрицы, пронизанные системой сообщающихся макропор.



**Рис. 3.1.** Принципиальная схема формирования полимерных криогелей *а*) и криоструктуратов *б*) [1]

Следующими ключевыми параметрами является природа и концентрация самих предшественников. Если исходный раствор содержит компоненты, способные к гелеобразованию, т. е. к формированию трехмерной пространственной полимерной сетки, узлы которой стабилизированы межмолекулярными связями нефлуктуационной природы, то такое гелеобразование (рис. 3.1, *а*) может происходить и в определенном диапазоне отрицательных температур. После выдерживания системы в замороженном со-

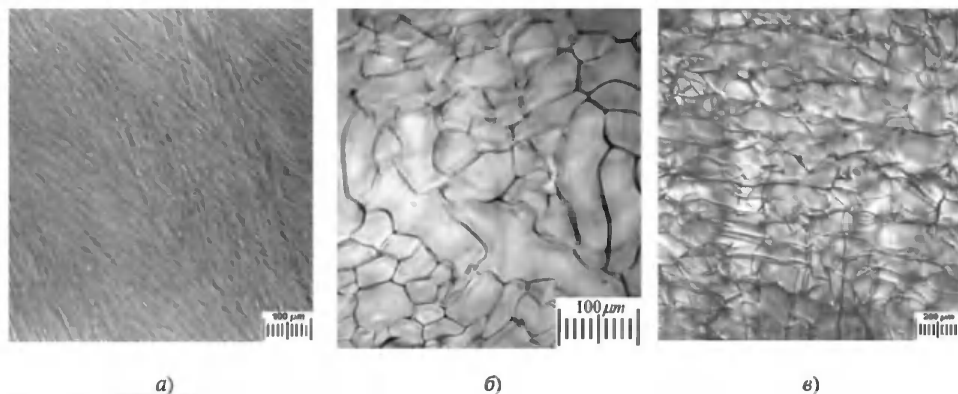
стоянии в течение необходимого времени и последующего размораживания получают пористые гелевые материалы, названные еще в 1984 г. термином *криогели* [55]. Собственно же сам процесс называют *криотропным* гелеобразованием [4] — от греческих слов *κρύος* (криос — мороз, лед) и *τροπικός* (тропикос — измененный, вызванный), т. е. гелеобразованием, вызываемым замораживанием. Отсюда: *криогели* — это макропористые полимерные гели, образование которых происходило в неглубоко замороженных системах «растворитель — предшественники».

В случае получения полимерных криоструктуратов (рис. 3.1, б) замораживаемый раствор не содержит гелеобразователей. Если образец оттаять, то опять будет раствор. Поэтому для создания криогенно-структурированного материала закристаллизованный растворитель нужно удалить, не размораживая систему. Тогда используют либо сублимационную сушку, либо криоэкстракцию кристаллической фазы ее растворителем (но нерастворителем для полимера) при температурах ниже области оттаивания замороженного образца. После удаления кристаллов растворителя получается пористый полимерный материал — несшитый криоструктурат, который для перевода в нерастворимую форму необходимо тем или иным способом сшить полимерные цепи друг с другом, что можно сделать обработкой химическим кросс-агентом в среде нерастворителя полимера или с помощью радиационного облучения. Конечный продукт такой последовательности операций — сшитый криоструктурат, способный набухать в исходном растворителе, но уже не растворяющийся в нем [1, 4, 11]. К криоструктуратам также можно отнести, но достаточно условно, макропористые матрицы, получающиеся в результате замораживания и затем сублимационной сушки заранее приготовленных набухших гелей. Хотя операционно такая методика не вызывает затруднений, но воспроизводимость свойств конечных образцов невысока вследствие возможности неконтролируемого механического разрушения сетки первичного геля растущими кристаллами замерзающего растворителя.

В зависимости от природы связей в узлах пространственной сетки полимерной фазы (т. е. стенок макропор) криогелей и криоструктуратов эти материалы в общем виде подразделяют на три основных группы: *ковалентные* (т. е. химически-сшитые), *нековалентные* (или физические) и *ионные/координационные* матрицы [1, 4, 11]. Естественно, что существуют и «смешанные» системы, где стабилизация узлов сетки обеспечивается связями не только какого-то одного типа.

Поскольку отличительной особенностью обсуждаемых здесь криогенно-структурированных полимерных материалов является макропористость, важна их классификация и по данному показателю. В этой связи мож-

но выделить два главных типа таких систем: *макропористые* криогели и криоструктураты с сечением пор от долей до единиц мкм (рис. 3.2, *а*) и *широкопористые* (или *сверхмакропористые*) матрицы с порами от десятков до сотен мкм (рис. 3.2, *б*, *в*).



**Рис. 3.2.** Морфология макропористого поливинилспиртового криогеля *а*) [1], сверхмакропористого хитозанового криогеля *б*) [57] (разрешение Springer Nature) и широкопористого альбуминового криоструктурата *в*) [54]

В целом характер пористости обоих типов подобных материалов зависит от природы, свойств и концентрации предшественников, а также от режимов криогенного структурирования. На рис. 3.2 в качестве типичных примеров приведены микрофотографии, показывающие структуру макропористого нековалентного криогеля поливинилового спирта (*а*), широкопористого губчатого криогеля на основе ковалентно-сшитого хитозана (*б*) и также широкопористого криоструктурата, приготовленного по схеме, соответствующей рис. 3.1, *б* из водного раствора сывороточного альбумина (*в*). Темные участки на этих кадрах — полимерная (гелевая) фаза стенок макропор, светлые участки — сами макропоры, заполненные водой. Понятно, что возможны и криогенно-структурированные материалы с порами «промежуточного» сечения, а также матрицы, в которых одновременно имеются поры разной величины, т. е. существует определенная иерархия из размеров от долей мкм до единиц мм [58].

\* \* \*

Именно особый характер пористости криогелей и криоструктуратов, а также широкие возможности варьирования текстуры таких полимерных матриц определяют их перспективность для использования в качестве полимерной основы при разработке и создании инновационных материалов



биомедицинского назначения. Ряд примеров подобных систем обсуждается ниже; при этом порядок рассмотрения вариантов получения различных криогелей и криоструктуратов тот же, что и для их классификации в отношении природы межмолекулярных связей в узлах трехмерной сетки полимерной фазы этих материалов, т. е. сначала речь пойдет о ковалентных (химически-сшитых), далее — о нековалентных (физических), и затем — об ионных/координационных матрицах.

## 3.2. Химически-сшитые полимерные криогели и криоструктураты

Как известно [59–61], ковалентно-сшитые полимерные сетки и гели на их основе могут быть получены либо из мономерных предшественников, либо химическим или радиационным сшиванием высокомолекулярных предшественников. Оба эти варианта были реализованы и в замороженных системах с одновременным криоструктурированием образующейся макропористой матрицы, т. е. соответствующего криогеля (рис. 3.1, а) [1–14]. При формировании ковалентно-сшитых криоструктуратов (рис. 3.1, б) предшественники всегда полимерные.

Большинство специфических эффектов, свойственных процессам образования ковалентных криогелей, по своему характеру близки при использовании и низкомолекулярных, и макромолекулярных предшественников. В качестве примера в первом случае можно привести подробно изученный синтез полиакриламидных гелей и криогелей сополимеризацией винильного мономера — акриламида с дивинильным мономером — N,N-метиленбис-акриламидом в растворе и в неглубоко замороженной среде (рис. 3.3) [1, 4, 62–67], во втором случае — синтез хитозановых геля и криогеля сшиванием этого полиаминосахарида с помощью глутарового альдегида также при положительных и отрицательных температурах (рис. 3.4) [1, 57, 62, 68–70].

Один из таких эффектов — это ускорение гелеобразования при определенных минусовых температурах по сравнению с процессом в незамороженной системе. Так, если понижение температуры реакционной системы приводит к естественному снижению скорости образования обычных полиакриламидных гелей (кривые +25 °С и +13 °С, рис. 3.3, б), а также к уменьшению общего выхода гель-фракции, то проведение реакции в неглубоко замороженной среде способствует как более быстрому гелеобразованию (кривые –15, –20 и –25 °С, рис. 3.3б), так и повышению выхода гель-фракции. Исследования показывают, что ускорение процессов формирования полимерных сеток в определенном интервале отрицательных

температур замороженных систем — это *типичный эффект* для криотропного гелеобразования вообще [1, 4, 11], а не только для конкретного случая синтеза полиакриламидных криогелей.

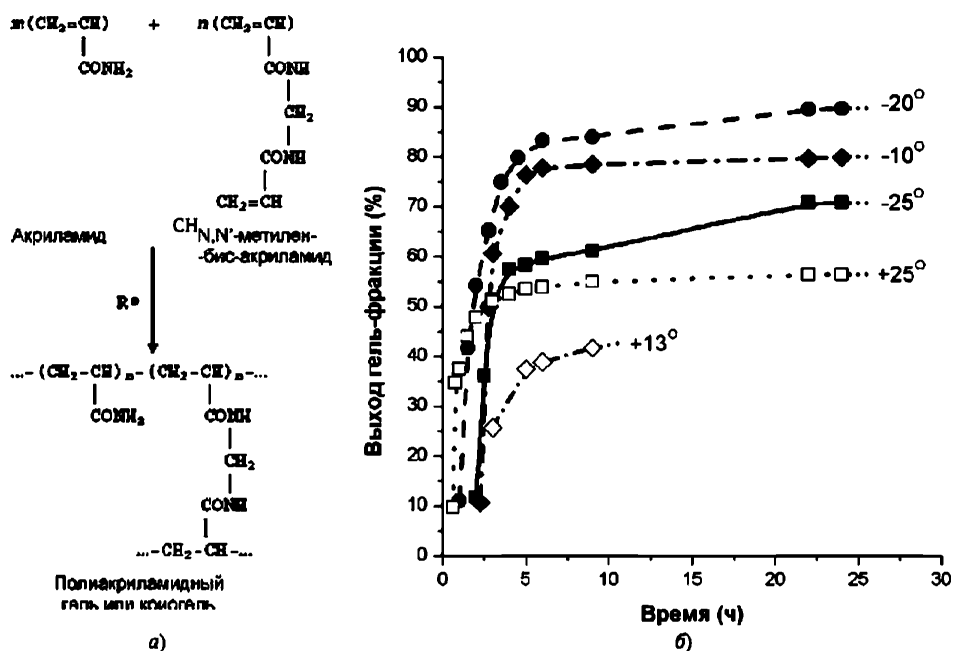


Рис. 3.3. Схема синтеза ковалентных полиакриламидных гелей и криогелей а) и кинетические кривые гелеобразования при разных температурах б) [1]

Следующей характерной особенностью процессов, приводящих к получению полимерных криогелей, является снижение минимальных значений концентрации предшественников, при которой трехмерная сетка во всем объеме реакционной системы вообще может образоваться (так называемая *критическая концентрация гелеобразования* — ККГ). Этот эффект на примере синтеза ковалентно-сшитых хитозановых гелей и криогелей демонстрируется графиками рис. 3.4, показывающими зависимости выхода гель-фракции от исходных концентраций полимера (б) и кросс-агента (в), в последнем случае приведенной в виде мольного отношения СНО-групп глутарового альдегида и аминогрупп хитозана. В частности, значение ККГ при +22,5 °С лежит в области концентрации полимера примерно 25 г/л (~2,5%), тогда как при проведении синтеза в замороженной (-22,5 °С) среде криогель можно получить из исходного раствора, впятеро менее концентрированного по хитозану (рис. 3.4, б). То же самое относится и к ККГ для сшивающего агента: криогель удастся сформировать при гораздо меньшем исходном содержании глутарового альдегида в исходном

растворе, чем при синтезе геля при плюсовой температуре (рис. 3.4, в). И эта тенденция тоже имеет *общий характер* при сравнении большинства процессов криотропного гелеобразования с гелеобразованием аналогичных начальных систем в жидких средах.

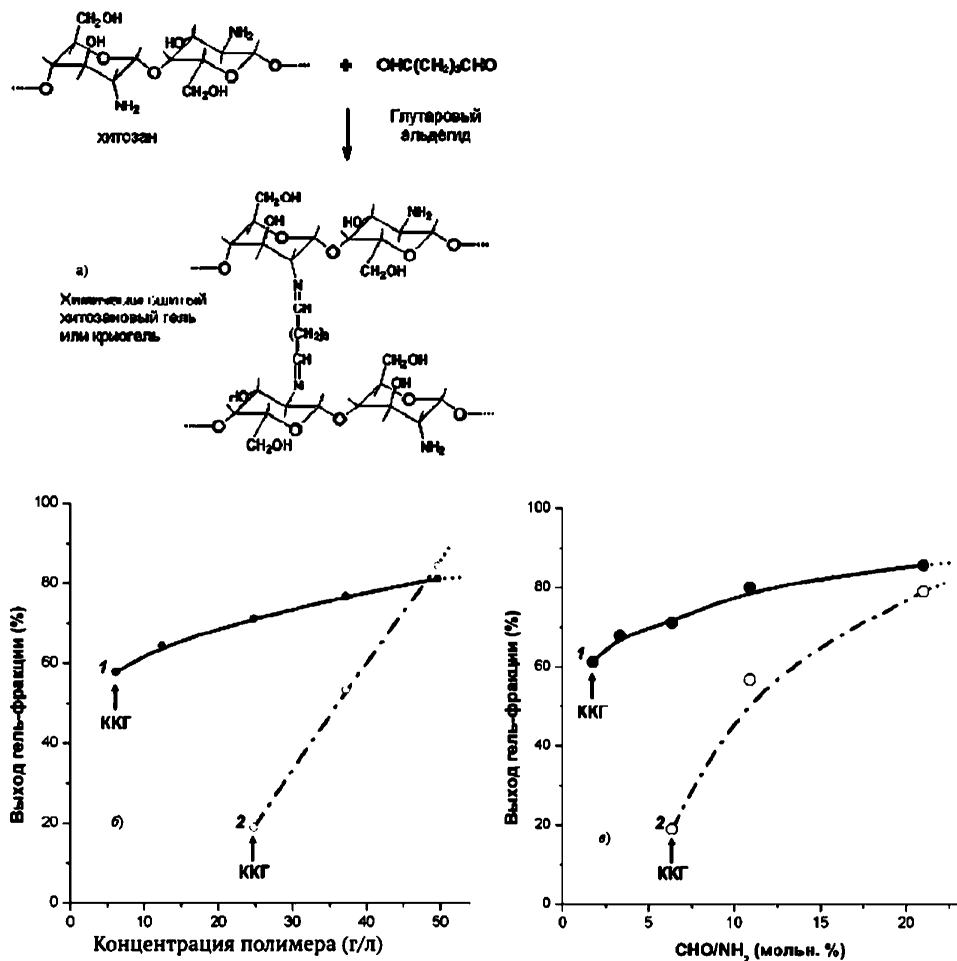
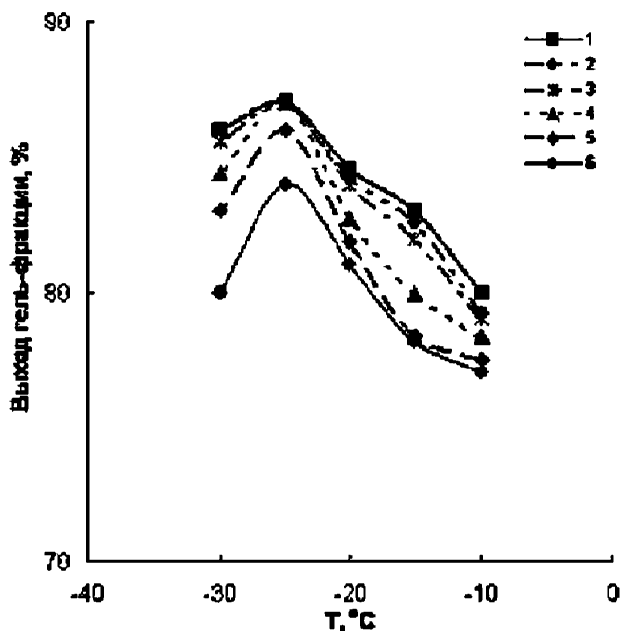


Рис. 3.4. Схема синтеза гелей и криогелей на основе хитозана, химически-сшитого глутаровым альдегидом, в зависимости от концентрации полимера а) и сшивающего агента в) (1:  $-8^\circ\text{C}$ , 2:  $+24^\circ\text{C}$ ) [1]

Конечно, «интенсивность» проявления обсуждаемых эффектов в существенной мере зависит от температуры криогенного процесса. Приведенные на рис. 3.5 зависимости выхода гель-фракции для образцов хитозановых криогелей, сшиваемых глутаровым альдегидом при разных отрицательных температурах, имеют колоколообразный вид, что также *типично*

для криотропного гелеобразования вообще, где всегда наблюдается подобного вида экстремальная зависимость эффективности и (как правило) скорости процесса от температуры замороженной реакционной системы.



**Рис. 3.5.** Температурная зависимость выхода гель-фракции для хитозановых криогелей при мольном соотношении  $\text{NH}_2:\text{CHO} = 2,5:1$  (1),  $5:1$  (2),  $10:1$  (3),  $15:1$  (4),  $20:1$  (5), и  $25:1$  (6) [57] (разрешение Springer Nature)

Важно, что приведенные выше специфические эффекты криотропного гелеобразования присущи не только процессам в водных средах, но и гелеобразованию органорастворимых предшественников в замороженных органических средах. Например, при сравнении результатов синтеза полистирольных гелей и криогелей сшиванием цепей полистирола с помощью 4,4'-ксилилендихлорида по реакции Фриделя-Крафца (катализатор —  $\text{SnCl}_4$ ) в среде, соответственно, жидкого и замороженного нитробензола (рис. 3.6, а) для криотропного гелеобразования наблюдается и снижение ККГ (рис. 3.6, б), и экстремальная температурная зависимость эффективности процесса (рис. 3.6, в) [1, 55]. Отсюда следует, что такие эффекты имеют универсальный характер для различных сред при использовании растворителей, кристаллизующихся при замерзании реакционной системы.

Наконец, принципиальное отличие криогелей от гелей, сформированных из одинаковых растворов предшественников, состоит в существенно разном характере пористости этих гелевых матриц. Если *гель* образуется

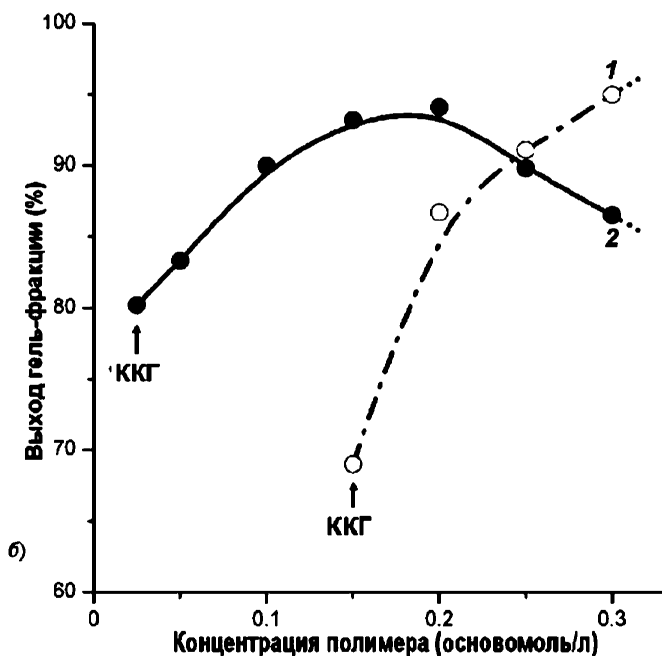
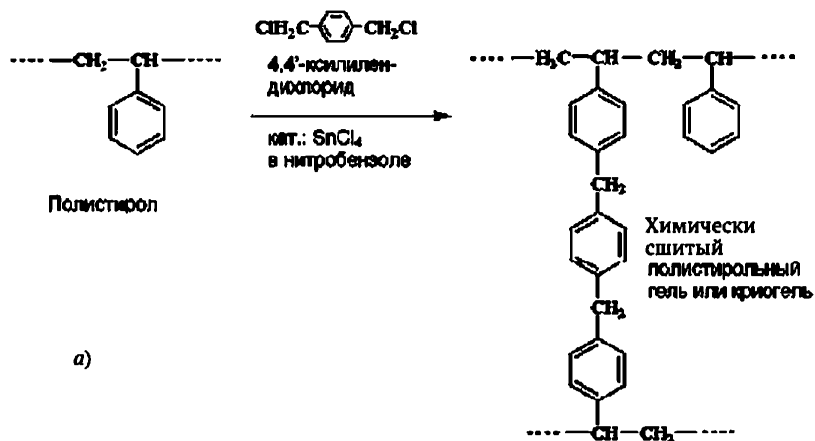
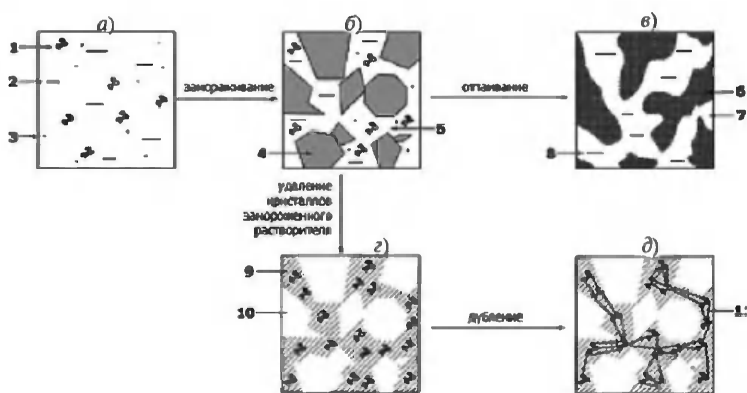


Рис. 3.6. Схема синтеза сшитых 4,4'-ксилилендихлоридом полистирольных гелей или криогелей а); зависимости выхода гель-фракции от исходной концентрации полимера (1: +22,5 °С, 2: -22,5 °С) б) и от температуры реакции в) [1]

в исходно жидкой системе при положительных температурах, и отсутствуют привнесенные извне пороги, а также не протекают процессы фазового расслоения, то получающаяся изотропно-набухающая пространственная полимерная сетка является однофазным гелем [59]. Его пористость име-

ет молекулярные размеры и определяется частотой швов сетки. В свою очередь, *криогели* всегда гетерофазны (рис. 3.1, *a*), поскольку криотропное гелеобразование происходит в присутствии «самоформирующегося» порогена — поликристаллов замороженного растворителя [1–11]. Их размеры многократно превосходят диаметр ячеек полимерной сетки однофазных гелей, поэтому криогенно-структурированным полимерным матрицам свойственна выраженная макропористость (рис. 3.2). То же самое, конечно, относится и к криоструктурам, которые тоже всегда гетерофазны и представляют собой полимерный каркас, пронизанный крупными и мелкими порами, остающимися в объеме материала после удаления кристаллов замороженного растворителя (рис. 3.1, *б*).

Таким образом, данные рис. 3.2–3.6 указывают на ряд значительных отличий процессов криотропного гелеобразования от формирования «традиционных» гелей из растворов соответствующих предшественников. Отсюда следует вполне естественный вопрос о причинах подобных отличий. Помогает получить ответ на него представление главных стадий криоструктурирования полимерных систем в виде схематической диаграммы (рис. 3.7).



**Рис. 3.7.** Схематическая диаграмма формирования полимерных криогелей и криоструктуратов согласно вариантам (*a*) и (*б*) рис. 3.1: *a*) раствор предшественников; *б*) замороженная система; *в*) криогель; *г*) криоструктурат (несшитый); *д*) нерастворимый (сшитый) криоструктурат. Обозначения: 1 — высокомолекулярные предшественники; 2 — растворитель; 3 — низкомолекулярные предшественники или растворимые вещества; 4 — поликристаллы замерзшего растворителя; 5 — незамерзшая жидкая микрофаза; 6 — полимерный каркас криогеля (гелевые стенки макропор); 7 — макропоры; 8 — оттаявший растворитель; 9 — полимерная фаза; 10 — «пустые макропоры»; 11 — межмолекулярные швы

Когда исходный раствор *a*) предшественников (1 и 3) будущего криогеля или криоструктурата замораживает при умеренной отрицательной темпе-

ратуре, то замороженная система б), хотя внешне выглядит полностью твердой, на микроскопическом уровне она гетерофазна и наряду с поликристаллами (4) замерзшего растворителя содержит некую незамерзшую часть (5), где растворенные вещества концентрируются. Такие жидкие включения в неглубоко замороженных многокомпонентных растворах Сергеев и Батюк с сотрудниками назвали термином «*незамерзшая жидкая микрофаза*» (НЖМФ) [19, 71, 72]. Именно в ее объеме благодаря сильному повышению концентраций предшественников процессы гелеобразования прототируются. Фактически криогель формируется в гораздо более концентрированном растворе, чем исходная система, что и проявляется в виде эффекта снижения ККГ (рис. 3.4, б, в).

Криоконцентрирование является также одной из главных причин ускорения гелеобразования в подобных замороженных системах, а экстремальный характер зависимостей эффективности и скорости процесса от температуры криоструктурирования является следствием конкуренции ускоряющих и замедляющих факторов. Замедляющие факторы вполне очевидны: это падение интенсивности процессов при понижении температуры, очень высокая вязкость НЖМФ, возникновение сетки образующегося криогеля или сетки топологического зацепления полимерных цепей будущего криоструктурата. Главный способствующий гелеобразованию фактор — это криоконцентрирование предшественников; для экзотермических реакций термодинамически благоприятным моментом является еще и отведение тепла от системы.

Если в замороженном образце б) произошло гелеобразование, то после оттаивания системы получается криогель в), где полимерная фаза (6) пронизана системой макропор (7), заполненных растаявшим растворителем (8). Подобная макропористая, а очень часто и сверхмакропористая (губчатая) морфология полимерных криогелей является, как уже подчеркивалось, их характерной отличительной особенностью. Поскольку каждый кристалл замерзающей жидкости растет, пока не упрется в грань соседнего кристалла, то поры в криогелях получаются взаимосвязанными. Чем ниже температура замораживания, тем меньше размер образующихся кристалликов, и поэтому соответствующие криогенно-структурированные полимерные матрицы имеют меньшее сечение макропор. Отсюда также ясно, почему для формирования криогелей нужен кристаллизующийся растворитель; если же растворитель при охлаждении стеклует, то не будет ни НЖМФ, ни эффектов криоконцентрирования предшественников, ни образования частиц порога. В свою очередь, когда в закристаллизованном растворе полимерного предшественника б) криотропного гелеобразования нет, а поликристаллы растворителя тем или иным способом удаляют из замороженной системы без ее оттаивания, то в результате

получается пористый криоструктурат (г), высококонцентрированная полимерная фаза которого (9) — это тонкие стенки «пустых» макропор (10). Последующая обработка подходящим дубителем сшивает (11) полимерные цепи, делая материал (д) нерастворимым.

При набухании криогелей и криоструктуратов общий объем поглощаемого губчатым материалом растворителя складывается из капиллярной жидкости, быстро проникающей во взаимосвязанные крупные поры, и сольватного растворителя в собственно гелевой фазе, т. е. в стенках макропор. Как правило, первая величина составляет десятки мл на грамм сухого полимера, вторая — единицы мл, т. е. основная часть жидкости, удерживаемой подобными набухшими макропористыми матрицами, приходится на слабо связанный растворитель, заполняющий пространство крупных пор. Эту жидкую фракцию в случае необходимости можно достаточно просто удалить при аккуратном сдавливании набухшей губки, а при последующем погружении отпрессованного образца в такой же растворитель материал быстро набухает с полным восстановлением объема и формы.

\* \* \*

В целом можно сказать, что как раз особая пористость полимерных криогелей и криоструктуратов, в том числе и обсуждавшихся в этом разделе ковалентно-сшитых криогенно-структурированных матриц, делает их привлекательными материалами с точки зрения возможностей применения подобных систем в биологии и медицине. Публикаций по этой тематике очень много. Даже простое перечисление известных вариантов включало бы сотни работ, поэтому ниже цитируются только обзорные статьи, некоторые патенты и примеры, в разработке и исследовании которых принимала участие лаборатория автора данной главы.

Наличие у криогелей и криоструктуратов сообщающихся крупных пор позволяет использовать такие матрицы в работе не только с молекулярными объектами, но и биологическими частицами, например вирусами, органеллами, целыми клетками. Так, криогенно-структурированные губки на основе синтетических и природных полимеров использовались в качестве носителей иммобилизованных молекул [4–7, 42] и клеток [4–7, 27, 73–76], как полимерные матрицы для иммуно- и биоаффинных сорбентов [24, 25, 29, 36, 39, 77, 78], в работах по клеточной и тканевой инженерии применялись в качестве широкопористых подложек для культивирования клеток человека и животных [30, 34, 41, 79–81], а при разработке материалов медицинского назначения использовались в виде губчатых носителей лекарственных форм в покрытиях на раны и ожоги [16, 48, 82–84].



### 3.3. Нековалентные (физические) полимерные криогели и криоструктураты

Криогенно-структурированные нековалентные макропористые полимерные матрицы, узлы трехмерной сетки которых поддерживаются за счет физических контактов, в частности, водородными связями или межмолекулярными гидрофобными взаимодействиями, достаточно подробно исследованы в научном плане и уже используются для решения разнообразных прикладных задач [1–12, 20–28, 32, 37, 42, 43, 85–93]. При этом нековалентному криоструктурированию полимерных систем, а предшественниками получающихся физических криогелей почти всегда являются высокомолекулярные соединения, в основном свойственны те же эффекты, что и процессам образования гелевых матриц, сшитых в замороженных системах химически. В частности, при формировании нековалентных криогелей имеет место снижение ККГ. Например, 0,5%-ный раствор желатины не желеирует при +20 °С, тогда как после замораживания (–20 °С) и затем оттаивания получается губчатый криогель [85]. Такая же картина наблюдается для криотропного гелеобразования многих биополимеров: овальбумина [94], камедей лжеакакии [95, 96] и кассии [97], амилопектина и мальтодекстрина [98, 99], ксантана [100], коллоидных дисперсий коллагена [101] и других. Что касается индуцированного криогенной обработкой нековалентного гелеобразования синтетических полимеров, наиболее изученными примерами являются процессы получения криогелей поливинилового спирта (ПВС), образующихся после замораживания, выдерживания в замороженном состоянии и далее оттаивания концентрированных водных [1–4, 20–23, 28, 32, 37, 43, 56, 58, 85–91, 102–107] или неводных (в диметилсульфоксиде) [85, 108–110] растворов данного полимера.

Вызываемые замораживанием эффекты ускорения образования физических криогелей можно продемонстрировать на примерах полигалактоманнана из камеди лжеакакии или того же ПВС. В первом случае 2–4%-ные растворы полимера при комнатной температуре превращаются в механически-слабые гели только после 2–3-месячной выдержки, тогда как однократное замораживание-оттаивание быстро приводит к соответствующим криогелям [96]. Во втором случае — качественно аналогичная картина: концентрированные (8–16%) растворы ПВС очень медленно становятся лишь более вязкими при инкубации в течение многих дней, в результате же криогенной обработки можно получить криогель с высокими физико-механическими характеристиками [2].

Некоторые из нековалентных криогелей обладают сверхмакропористой губчатой морфологией (например, криогели желатины [81, 85], крахма-

ла [111, 112] или агарозы [113–116]), другие имеют макропоры меньшего размера и внешне выглядят как сплошные материалы (в частности криогели на основе ПВС [1–4, 56, 117–119] или амилопектина [98]), а криогели на основе камеди лжеакции при невысокой (до  $\sim 2\%$ ) концентрации этого полисахарида — губчатые, при большем же содержании полимера ( $> 3\%$ ) в исходном растворе — образцы получаются похожими на мягкие, но внешне сплошные, криогели ПВС [96]. В целом же, свойства и структура нековалентных криогелей определяется совокупностью многих параметров, что ниже иллюстрируется на примере наиболее полно изученных криогелей ПВС.

Прежде всего, существенными факторами являются собственные характеристики гелеобразующего полимера, в частности, его молекулярная масса, количество неомыленных О-ацильных группировок (т. е. степень деацилирования ПВС) и тактичность цепей, а также содержание полимера в подвергаемом замораживанию растворе [2, 10, 11, 56, 86, 103, 120]. На графиках рисунка 8 показано как молекулярная масса ПВС и его концентрация влияют на механические (условно-мгновенный сдвиговый модуль упругости —  $G_0$ , рис. 3.8, *а*) и теплофизические (температура плавления —  $T_f$ , рис. 3.8, *б*) свойства криогелей ПВС, сформированных при одинаковых условиях криогенной обработки, а микрофотографии тонких срезов соответствующих образцов, показывают (рис. 3.9) влияние тех же факторов на макропористую морфологию таких гелевых матриц.

В частности, и увеличение длины цепей ПВС, на основе которого формируются затем криогели, и применение более высококонцентрированных растворов полимерного предшественника приводит к росту жесткости (показанному на рис. 3.8, *а*) и теплостойкости (рис. 3.8, *б*) этих физических криогелей [56]. При этом также меняются параметры пористости — чем выше концентрация ПВС, тем меньше общий объем макропор в соответствующем криогеле (рис. 3.8, *а-в*), а значения среднего размера пор проходят через максимум (рис. 3.8, *а-в*). В то же время, с повышением молекулярной массы используемого полимера при одинаковом его содержании в системе общая пористость возрастает, но сечение пор уменьшается (рис. 3.8, *б, г, д*).

Влияние режимов криогенной обработки растворов ПВС на свойства и микроструктуру криогелей, получаемых после оттаивания замороженных образцов, многофакторно. Значимыми параметрами являются скорость охлаждения исходного раствора полимера при его замораживании [121–123], температура и длительность выдерживания образцов в замороженном состоянии [2, 10, 11, 56, 86, 104, 105, 117, 120], скорость нагревания замороженной системы при ее оттаивании [2, 10, 11, 56, 121, 124], число циклов замораживания-размораживания [2, 3, 10, 11, 89, 103, 106, 117, 119].

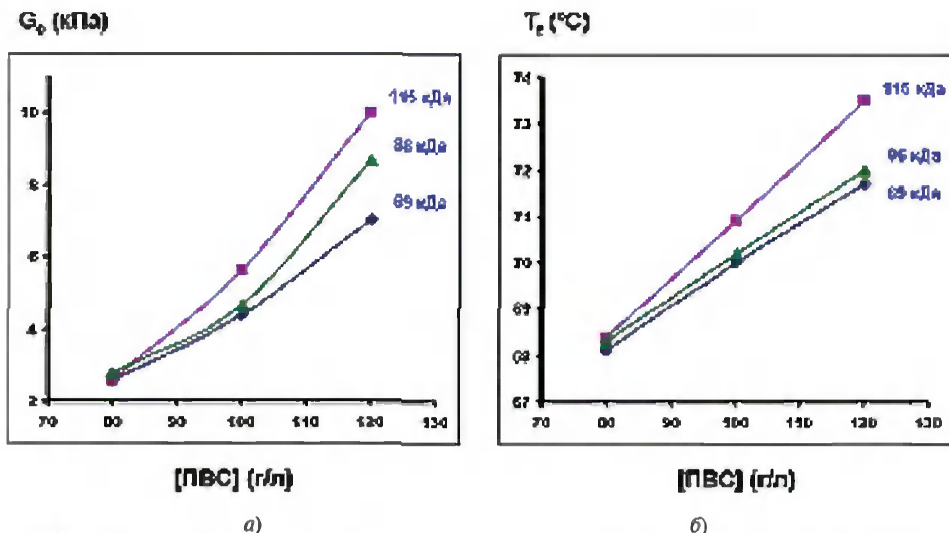


Рис. 3.8. Влияние исходной концентрации ПВС и его молекулярной массы на физико-механические а) и термические б) свойства криогелей ПВС (температура замораживания  $-20$  °C; инкубация в замороженном состоянии — 24 ч; скорость нагрева при оттаивании —  $0,3$  °C/мин) [56] (разрешение Springer Nature)

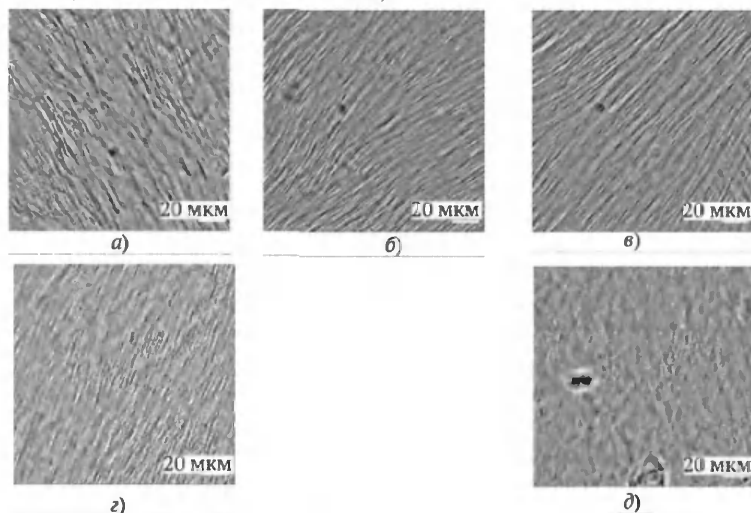


Рис. 3.9. Влияние исходной концентрации и молекулярной массы гелеобразующего полимера на макропористую морфологию криогелей ПВС [56] (разрешение Springer Nature). Температура замораживания  $-20$  °C; инкубация в замороженном состоянии — 24 ч; скорость нагрева при оттаивании  $0,3$  °C/мин; масштабная линейка — 20 мкм). Исходная концентрация ПВС: а) 80; б, з, д) 100; в) 120 г/л. Молекулярная масса ПВС: а–в) 69; з) 86; д) 115 кДа

Например, из данных рис. 3.10 следует, что зависимости показателей жесткости (*a*) и теплостойкости (*b*) криогелей ПВС от температуры криогенной обработки растворов полимерного предшественника имеют колоколообразный вид, характерный, как уже отмечалось, и для процессов образования химически сшитых криогелей, т.е. такой тип зависимостей универсален как для ковалентного, так и для нековалентного криотропного гелеобразования. Поскольку кристаллы отвержденного замораживанием растворителя в этих процессах выполняют функцию порообразователей, то естественно, что температура криогенной обработки влияет на макропористую морфологию получаемых криогелей (рис. 3.11). При этом изменения общей пористости образцов не показывают какой-то выраженной тенденции, а средний диаметр пор имеет наименьшее значение у материала, сформированного при  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (рис. 3.11, *e*).

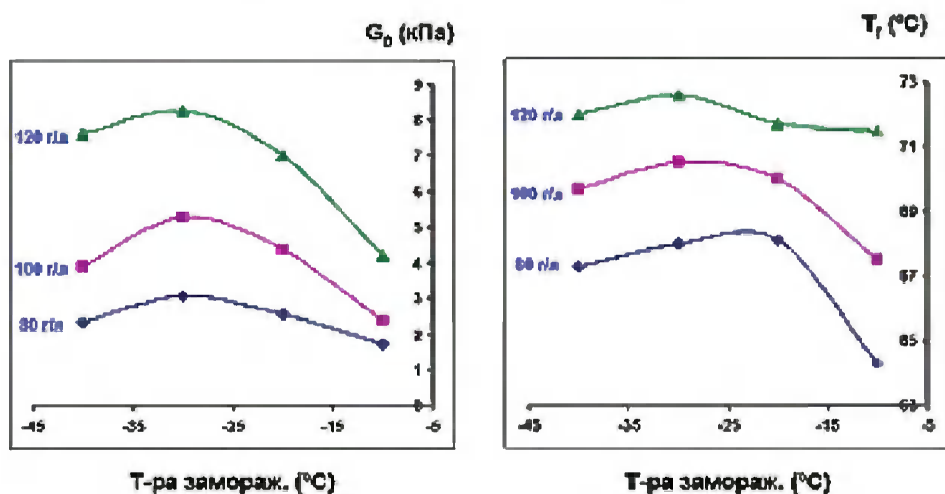


Рис. 3.10. Влияние температуры замораживания водных растворов ПВС (молекулярная масса 69 кДа) различной концентрации на физико-механические *a*) и термические *b*) свойства криогелей ПВС (инкубация в замороженном состоянии — 24 ч; скорость нагрева при оттаивании —  $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) [56] (разрешение Springer Nature)

Также оказалось [121], что для свойств и структуры нековалентных криогелей вообще, и криогелей ПВС в частности, большое значение имеют не только условия вызываемой замораживанием кристаллизации растворителя, т.е. условия формирования частиц порогеона, но и режим оттаивания замороженных препаратов. Этот эффект в отношении физико-механических (*a*) и теплофизических (*b*) свойств криогелей ПВС демонстрируют графики рис. 3.12, *a* характер и параметры макропористой мор-

фологии соответствующих образцов приведены под каждой из микрофотографий рис. 3.13. Чем медленнее нагревается замороженный препарат в ходе оттаивания, тем получаются более жесткие (рис. 3.12, а) и высокоплавкие (рис. 3.12, б) криогели.

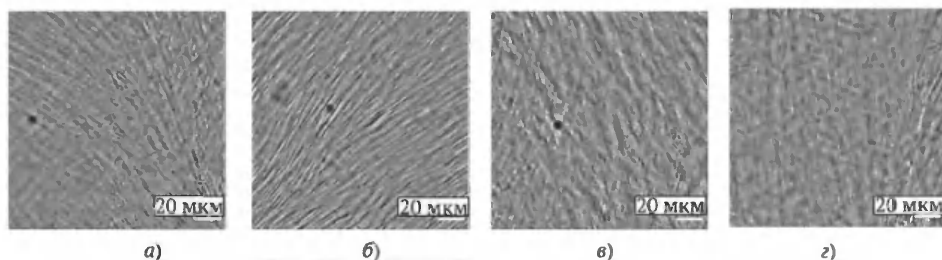


Рис. 3.11. Влияние температуры криогенной обработки растворов полимера на макропористую морфологию криогелей ПВС [56] (разрешение Springer Nature). Молекулярная масса ПВС — 69 кДа; концентрация ПВС в исходном растворе — 100 г/л; инкубация в замороженном состоянии — 24 ч; скорость нагрева при оттаивании 0,3 °С/мин; масштабная линейка — 20 мкм. а) -10 °С; б) -20 °С; в) -30 °С; г) -40 °С

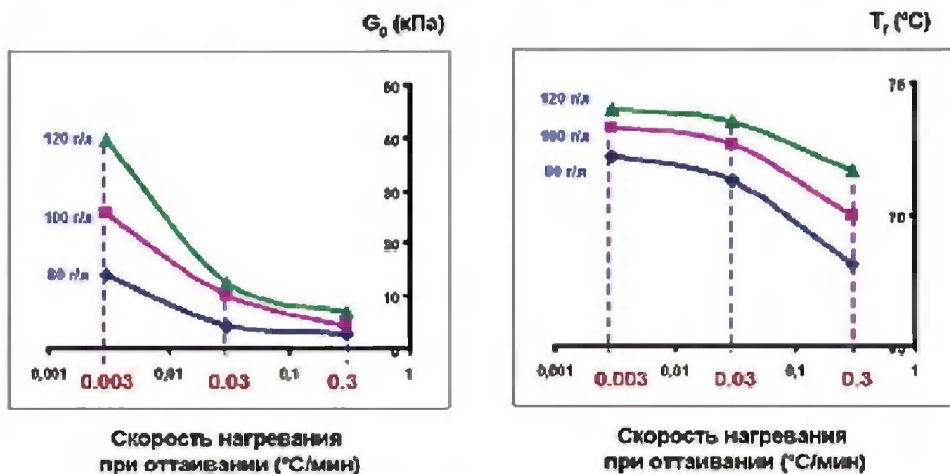
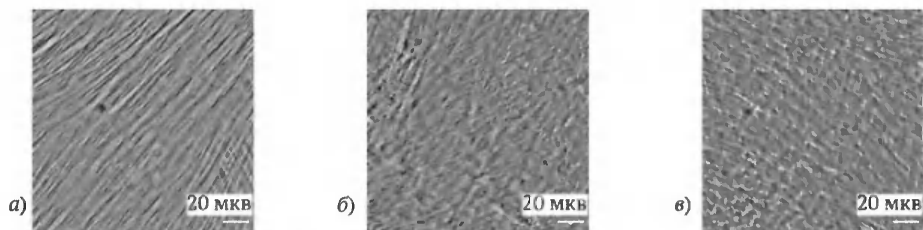


Рис. 3.12. Влияние динамики размораживания образцов на физико-механические а) и термические б) свойства криогелей ПВС с различной концентрацией гелеобразующего полимера (молекулярная масса ПВС — 69 кДа; температура криогенной обработки -20 °С; инкубация в замороженном состоянии — 24 ч) [56] (разрешение Springer Nature)

Поэтому при использовании медленного размораживания можно сформировать образцы в существенно менее концентрированной системе с тем же модулем упругости, что и при быстром оттаивании более концентрированных препаратов, поскольку медленное нагревание способствует упрочнению криогелей ПВС. Режим размораживания влияет и на их пористую

структуру, т. к. чем медленнее нагревается замороженный образец, тем выше вероятность протекания в нем процессов рекристаллизации льда. Анализ микрофотографий тонких срезов эквиконцентрированных по полимеру криогелей ПВС, размораживание которых проводилось нагреванием со скоростями 0,3 (рис. 3.13, а), 0,03 (рис. 3.13, б) и 0,003 (рис. 3.13, в) градуса в минуту, показывает, что при замедленном оттаивании получают препараты с более однородной текстурой и несколько меньшим средним размером макропор.



**Рис. 3.13.** Влияние динамики нагревания замороженных образцов на макропористую морфологию криогелей ПВС [56] (разрешение Springer Nature). Молекулярная масса ПВС — 69 кДа; концентрация ПВС в исходном растворе — 100 г/л; инкубация в замороженном состоянии — 24 ч; масштабная линейка — 20 мкм). а) 0,3 °С/мин; б) 0,03 °С/мин; в) 0,003 °С/мин

\* \* \*

В общем случае, многофакторность воздействия условий криогенного процесса на физико-химические характеристики и макропористую морфологию нековалентных криогелей позволяет варьировать их свойства в довольно широких пределах для адаптации к требованиям конкретных областей применения этих гелевых материалов. В частности, «улучшение» однородности макропористой структуры с помощью технически очень простого приема, т. е. всего лишь медленным нагреванием замороженных образцов при их оттаивании, весьма привлекательно для получения искусственных хрящей на основе криогелей ПВС [15, 16, 28, 32, 34, 37, 43, 89, 125–128], предложенных в медицинской практике для замены поврежденной хрящевой ткани, например эродированных менисков коленных суставов [37, 125] или пульпозного ядра межпозвоночных дисков [28, 37, 126]. Из других примеров медицинского применения физически-сшитых криогелей ПВС можно отметить гелевые матрицы для контролируемого высвобождения лекарств (controlled drug release systems) [2–4, 129–132], материалы для сердечно-сосудистой хирургии [2–4, 133–137], гелевые стандарты для калибровки ЯМР томографов [22, 33] и диагностической ультразвуковой

аппаратуры [138]. Практически во всех этих случаях требуется определенное сочетание упругости, пластичности, теплостойкости, пористости и, как следствие, диффузионных характеристик соответствующих криогелей, поэтому знание тонких механизмов их образования и владение приемами регулирования указанных свойств позволяет целенаправленно улучшать эксплуатационные показатели таких «изделий». Кроме того, и это принципиально важно, результаты фундаментальных исследований процессов нековалентного криотропного гелеобразования служат основой для разработки новых оригинальных материалов биомедицинского назначения, базирующихся на физических полимерных криогелях.

### 3.4. Ионно- и координационно-сшитые полимерные криогели и криоструктураты

Для обычных иотропных и координационных гелей, формируемых при положительных температурах, известно три типа таких систем. Первые из них представляют собой сольватированные полиэлектролитные сетки, где макромолекулярные цепи «защиты» в пространственную структуру низкомолекулярными ионами, образующими с ионогенными группировками цепей полиэлектролита малодиссоциированные солевые мостики в узлах трехмерной сетки. Когда функцию сшивателя выполняют комплексообразователи, то возникает хелатная (координационная) сетка. Такие иотропные и хелатотропные гели после высушивания способны к значительному повторному набуханию.

Отдельный тип ионных гелей образуется при изменении заряда ионогенных группировок полиэлектролита, что приводит к снижению растворимости полимера и фазовому расслоению. Получающиеся в этом случае гелеподобные системы, как правило, обладают низкой механической прочностью, а после высушивания они не способны в значительной степени набухать в среде того же состава, где протекало гелеобразование. Наконец, третий вариант — это иотропные гели, формирующиеся при приготовлении полиэлектролитных комплексов. Эти системы являются набухшими пространственными сетками, также сшитыми слабодиссоциирующими солевыми связями подобно ионным гелям первого типа. Однако в данном случае часто просто невозможно указать, какой из компонентов системы — поликатион или полианион — является гелеобразователем и сшивателем, особенно если степени полимеризации и исходные концентрации этих соединений близки.

Очень важно, что формирование обычных иотропных гидрогелей — весьма быстрый процесс [139]. Например, после смешивания водных рас-

творов альгината натрия (Na-соль блочного линейного сополимера D-маннуровой и L-гулуриновой кислот) и соли кальция ионно-сшитый Са-альгинатный гель образуется в считанные секунды [140, 141]. Поэтому технически очень трудно провести само гелеобразование в замороженной среде, т. к. замораживается уже сформировавшаяся сетка. В свою очередь, это приводит к ее частичному разрушению растущими кристаллами льда и, во-вторых, препятствует эффективному криоконцентрированию компонентов в незамерзшей жидкой микрофазе.

Поэтому, чтобы сформировать иотропный *криогель*, приходится использовать специальные приемы. Так, если к раствору полиэлектролита в качестве источника сшивающих противоионов добавить тонко измельченную соль, имеющую отрицательный температурный коэффициент растворимости, и заморозить полученную суспензию, то за счет понижения температуры происходит постепенное растворение такой соли в незамерзшей микрофазе с одновременным иотропным сшиванием цепей полиэлектролита. После оттаивания получается макропористый криогель. Здесь важен правильный выбор соли и, по-видимому, степени ее помола. Описанным примером осуществления такой методики является получение альгинатных криогелей [4, 142] с использованием солей поливалентных металлов, растворимость которых увеличивается с понижением температуры. Все же этот вариант получения иотропных криогелей имеет ограничения, обусловленные допустимыми концентрациями предшественников: выше определенного уровня концентрации полиэлектролита или низкомолекулярной соли слишком быстрое гелеобразование еще при положительных температурах будет препятствовать формированию «истинного» криогеля. Как следствие, воспроизводимость свойств таких криогелей от партии к партии невысока.

В этой связи, более надежный путь — это первоначальное формирование криоструктурата в отсутствие кросс-агента и только затем ионное/координационное сшивание или перезарядка ионногенных групп полиэлектролита для перевода его в нерастворимую форму (рис. 3.14) [1, 4, 143, 144]. Для этого исходный раствор макромолекулярного ионного предшественника, причем любой удобной концентрации, замораживают, затем образовавшиеся поликристаллы растворителя без оттаивания удаляют либо сублимацией в вакууме, либо криоэкстракцией, а получившийся сухой криоструктурат помещают в раствор сшивающего или замещающего ионного или хелатирующего кросс-агента в среде нерастворителя для полимера, где за счет ионного обмена или комплексообразования фактически в твердой фазе происходит сшивка или перезарядка цепей с получением уже нерастворимого в воде широкопористого полимерного материала.



Примерами подобных криоструктуратов, полученных с помощью таких приемов, являются губчатые кальций-альгинатные матрицы [143], криоструктураты на основе пектовой или альгиновой кислот [80, 143] и хитозана [144]. Первые из них формируют замораживанием растворов альгината натрия с последующей лиофилизацией образцов и затем обработкой насыщенным спиртовым раствором  $\text{CaCl}_2$ , что приводит к широкопористому водонерастворимому Са-альгинатному материалу.

В свою очередь, для получения альгиновых и пектатных матриц соответствующий натрий-альгинатный или калий-пектатный криоструктурат обрабатывают спиртовым раствором уксусной кислоты для превращения солевой формы полиэлектролита в слабо-диссоциированную кислотную форму, после чего поликарбоксовая губка только набухает, но уже не растворяется в воде. Для получения широкопористых хитозановых матриц замораживают раствор солевой формы (ацетат, хлоргидрат) этого полиаминосахарида, а после удаления закристаллизованного растворителя пористый криоструктурат помещают в аммиачно-спиртовой раствор для депротонирования  $\text{NH}_2$ -групп полимера и получения водонерастворимой губчатой матрицы, состоящей из хитозана-основания.

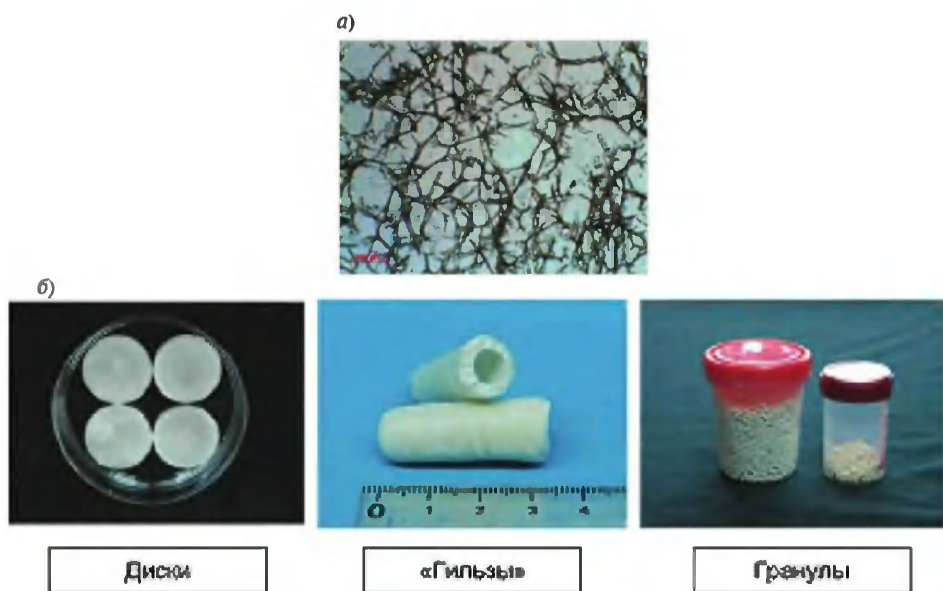
**Рис. 3.14.** Общая схема формирования ионных/координационных криоструктуратов [1]



Концентрация полимера в исходном растворе и условия замораживания в определенной степени влияют на прочностные характеристики материала и его широкопористую морфологию. Наблюдаемая в световом стереомикроскопе типичная текстура Са-альгинатного криоструктурата

показана на рис. 3.15, а, где хорошо виден сообщающийся характер макропор сечением до 120 мкм [145], а фотографии на рис. 3.15, б демонстрируют, что на базе этого и подобных криогенно-структурированных материалов могут быть получены «изделия» различного размера и формы [146].

Оказалось [146], что сформированные согласно схеме рисунка 14 Са-альгинатные криоструктураты не теряют своей целостности даже в жидких средах, где обычные альгинатные гидрогели достаточно быстро растворяются. В частности, криоструктураты в течение, по крайней мере, 3 недель стабильны в физиологическом растворе (0,15M NaCl), тогда как гидрогель, приготовленный смешиванием раствора полимера с раствором  $\text{CaCl}_2$ , сильно набухал и распадался за 2-3 дня. Еще быстрее такой препарат растворялся в щелочной среде (0.01N NaOH), а вот изменения целостности криоструктурата можно было наблюдать только не менее чем через неделю инкубации в таких условиях. Скорее всего, столь высокая стабильность Са-альгинатных криоструктуратов обусловлена концентрированием полимера в стенках макропор и максимальной степенью сшивки цепей в ходе обработки матрицы большим избытком ионов кальция.



**Рис. 3.15.** Са-альгинатные криоструктураты [146]: (а) — широкопористая морфология (оптический стереомикроскоп); б) — образцы материала различного размера и геометрии

Ионно- и координационно-сшитые криогенно-структурированные макропористые полимерные матрицы на основе нетоксичных и биосовместимых макромолекулярных предшественников, так же как аналогичные по природе ковалентные и физические криогели и криоструктураты, представляют большой интерес в качестве материалов биомедицинского назначения. Например, лиофилизированные Са-альгинатные криогели (препараты серии «Альгипор» [147] и их аналоги [142, 148]) используются в качестве заживляющих покрытий на раны и ожоги, а криоструктураты на основе альгината кальция (рис. 3.15) обладают кровоостанавливающими свойствами [146]. Также альгинатные губки, содержащие антибактериальные агенты (антибиотики, бактерициды, наночастицы биологически-активных металлов) рассматриваются как перспективные депо-формы различных медикаментозных средств [48]. Самостоятельное значение имеют подобные матрицы и для тканевой инженерии [149–152], особенно когда к альгинатному каркасу привиты лиганды, способствующие хорошей адгезии клеток [79, 145, 146, 153–156]. Положительные результаты испытаний для тех же целей показали хитозановые криоструктураты [80, 157], а координационно-сшитые хитозановые криогели с включенными в полимерную матрицу наночастицами золота или платины предложены в качестве каталитически-активных материалов [158]. Все это свидетельствует об актуальности исследований, связанных с поиском новых областей применения уже известных ионных/координационных криогенно-структурированных матриц и разработкой следующих поколений подобных полимерных материалов биомедицинского назначения.

## Заключение

В заключение обсуждения процессов криоструктурирования макромолекулярных систем и применения этих подходов к получению инновационных полимерных материалов биомедицинского назначения подведем краткие итоги:

1. В результате криогенной обработки исходных растворов мономерных или полимерных предшественников можно сформировать макропористые полимерные материалы двух основных типов: *криогели* (когда в замороженной среде происходит образование узлов трехмерной полимерной сетки) и *криоструктураты* (когда сшитая сетка не образуется, а закристаллизованный растворитель тем или иным методом удаляется из замороженного препарата).
2. Криотропное гелеобразование протекает в незамерзшей жидкой микрофазе макроскопически замороженных образцов. Криотропное гелеобразование может происходить в замороженных как водных, так и

органических средах, при условии, что используемый растворитель и режимы охлаждения системы обеспечивают ее кристаллизацию.

3. Криогели и криоструктураты обладают специфической макропористой текстурой, причем крупные поры взаимосвязаны. Роль порога при формировании и криогелей, и криоструктуратов выполняют кристаллы замерзшего растворителя, поэтому характер пористости получаемого полимерного материала определяется режимами кристаллизации и, иногда, рекристаллизации.
4. В целом совокупность свойств и макропористой морфологии полимерных криогелей и криоструктуратов зависит от условий криогенной обработки, природы используемого растворителя, типа (мономерные или полимерные предшественники) и концентрации гелеобразователей, присутствия других растворимых веществ и нерастворимых наполнителей.
5. Полимерные криогели и криоструктураты, особенно их представители, сформированные на основе нетоксичных и разрешенных к медицинскому применению биополимеров, – перспективные материалы для биомедицинских областей науки и практики.

## Авторы

Лозинский Владимир Иосифович, д.х.н., проф., зав. лаб. ИНЭОС РАН; [loz@ineos.ac.ru](mailto:loz@ineos.ac.ru)

*Область научных интересов:* криоструктурирование полимерных систем, криогели и криоструктураты на основе синтетических и природных полимеров, практическое применение криогенно-структурированных полимерных материалов.

## Литература

1. Лозинский В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и применение. – Дис. докт. хим. наук, М.; ИНЭОС РАН, 1994, 682 с.
2. Лозинский В.И. Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта. – Успехи химии. 1998, **67**, 641.
3. Hassan C.M., Peppas N.A. Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. – Adv. Polym. Sci., 2000, **153**, 37.
4. Лозинский В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения. – Успехи химии. 2002, **71**, 559.
5. Lozinsky V.I. What new opportunities the use of diverse polymeric cryogels opens for the immobilization of molecules and cells. – Hemijska Industrija (Belgrade). 2004, **58**, 111.
6. Лозинский В.И. Новое семейство макропористых и сверхмакропористых материалов биотехнологического назначения – полимерные криогели. – Известия РАН, Сер. хим. 2008, № 5, 996.

7. Kumar A., Mishra R., Reinwald Y., Bhat S. Cryogels: freezing unveiled by thawing. — Mater. Today. 2010, **13**, 42.
8. Gun'ko V.M., Savina I.N., Mikhalovsky S.V. Cryogels: morphological, structural and adsorption characteristics. — Adv. Coll. Interface Sci., 2013, **187-188**, 1.
9. Tanthapanichakoon W., Tamon H., Nakagawa K., Charinpanitkul T. Synthesis of porous materials and their microstructural control through ice templating. — Engineering J., 2013, **17**, 1.
10. Lozinsky V.I. A brief history of polymeric cryogels. — Adv. Polym. Sci., 2014, **263**, 1.
11. Lozinsky V.I., Okay O. Basic principles of cryotropic gelation. — Adv. Polym. Sci., 2014, **263**, 49.
12. Okay O., Lozinsky V.I. Synthesis, structure-property relationships of cryogels. — Adv. Polym. Sci., 2014, **263**, 103.
13. Liu C., Tong G., Chen C., Tan Z., Quan C., Zhang C. Polymeric cryogel: preparation, properties and biomedical applications. — Progress in Chemistry. 2014, **26**, 1190.
14. Reichelt S. Introduction to macroporous cryogels. Meth. Molec. Biol., 2015, **1286**, 173.
15. Hasan S.M., Nash L.D., Maitland D.J. Porous shape memory polymers: design and applications. — J. Polym. Sci., Polym. Phys., 2016, **54**, 1300.
16. Hixon K.R., Lu T., Sell S. A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications. — Acta Biomater., 2017, **62**, 29.
17. Jiang S., Agarwal S., Greiner A. Low-density open cellular sponges as functional materials. — Angew. Chem., Int. Edn., 2017, **56**, 15520.
18. Nambu M. Rubber-like poly(vinyl alcohol) gel. — Kobunshi Ronbunshu 1990; **47**, 695.
19. Лозинский В.И., Вахула А.С., Зубов А.Л. Примененис криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. IV. Обзор литературных данных. — Биотехнология. 1992, № 4, 5.
20. Varfolomeev S.D., Rainina E.I., Lozinsky V.I. Cryoimmobilized enzymes and cells in organic synthesis. — Pure & Appl. Chem., 1992, **64**, 1193.
21. Chu K.C., Rutt B.K. Poly(vinyl alcohol) cryogel: an ideal phantom material for MR studies of arterial flow and elasticity. — Magn Reson. Med., 1997, **37**, 314.
22. Lozinsky V.I., Plieva F.M. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. — Enzyme Microb. Technol., 1998, **23**, 227.
23. Lozinsky V.I., Plieva F.M., Galaev I.Yu., Mattiasson B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. — Bioseparation. 2001, **10**, 163.
24. Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Plieva F.M., Savina I.N., Jungvid H., Mattiasson B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. — Trends in Biotechnol. 2003, **21**, 445.
25. Efremenko E.N., Senko O.V., Zubaerova D.H., Podorozhko E.A., Lozinsky V.I. Effective immobilized biocatalyst for the treatment of various foodwasters. — In: Biotechnology: State of the Art and Prospects for Development. Ed. By G.E.Zaikov. N.Y.: Nova Science Publishers Inc., 2008, Ch.11, pp.103-110.
26. Plieva F.M., Galaev I.Y., Noppe W., Mattiasson B. Cryogel applications in microbiology. — J. Microb. Meth., 2008, **16**, 543.
27. Wang B.H., Campbell G. Formulations of poly(vinyl alcohol) cryogel that mimic the biomechanical properties of soft tissues in the natural lumbar intervertebral discs. — Spine. 2009, **34**, 2745.
28. Kumar A., Srivastava A. Cell separation using cryogel-based affinity chromatography. — Nature Protocols. 2010, **5**, 1737.
29. Van Vlierberghe S., Dubruel P., Schacht E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. — Biomacromolecules. 2011, **12**, 1387.

30. *Bagri I.P., Bajpai J., Bajpai A.K.* Evaluation of starch based cryogels as potential bio-materials for controlled release of antibiotic drugs. — *Bull. Mater. Sci.*, 2011, **34**, 1739.
31. *Baker M.I., Walsh S.P., Schwatz Z., Boyan B.D.* A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. — *J. Biomed. Mater. Res.*, 2012, **100B**, 1451.
32. *Lamouche G., Kennedy B.F., Kennedy K.M., Bisailon C.E., Curatolo A., Campbell G., Pazos V., Sampson D.D.* Review of tissue simulating phantoms with controllable optical, mechanical and structural properties for use in optical coherence tomography. — *Biomed. Optics Expr.*, 2012, **3**, 1381.
33. *Henderson M.A., Ladewig K., Haylock D.N., McLean K.M., O'Connor A.J.* Cryogels for biomedical applications. — *J. Mater. Chem. B.*, 2013, **1**, 2682.
34. *Polymeric Cryogels: Macroporous Gels with Remarkable Properties.* Ed. Okay O., Cham e.a.: Springer. 2014. 330 p.
35. *Mattiasson B.* Cryogels for biotechnological applications. *Adv. Polym. Sci.*, 2014, **263**, 245.
36. *Wan W., Bannerman A.D., Yang L., Mak H.* Poly(vinyl alcohol) cryogels for biomedical application. *Adv. Polym. Sci.*, 2014, **263**, 283.
37. *Carvalho B.M.A., Da Silva S.L., Sa Silva L.H.M., Minim V.P.R., Da Silva M.C.H., Carvalho L.M., Minim L.A.* Cryogel poly(acrylamide): synthesis, structure and applications. — *Separ. Purif. Revs.*, 2014, **43**, 241.
38. *Ertürk G., Mattiasson B.* Cryogels — versatile tools in bioseparation. — *J. Chromatogr., A.* 2014, **1357**, 24.
39. *Choudhury S., Connolly D., White B.* Supermacroporous polyHIPE and cryogel monolithic materials as stationary phases in separation science: a review. — *Anal. Meth.*, 2015, **7**, 6967.
40. *Supermacroporous Cryogels: Biomedical and Biotechnological Applications.* Ed. Kumar A., Boca Raton: CRC Press. 2016. 480 p.
41. *Efremenko E.N., Lyagin I.V., Lozinsky V.I.* Enzymatic biocatalysts immobilized on/in the cryogel-type carriers. — In: *Supermacroporous Cryogels: Biomedical and Biotechnological Applications.* Ed. Kumar A. Boca Raton, CRC Press, 2016, Ch. 11. pp.301-324.
42. *Timofejeva A., D'Este M., Loca D.* Calcium phosphate/polyvinyl alcohol composite hydrogels: a review on the freeze-thaw synthesis approach and applications in regenerative medicine. — *Eur. Polym. J.*, 2017, **95**, 547.
43. *Damania A., Kumar A., Teotia A.K., Kimura H., Kamihira M., Ijima H., Sarin S.K., Kumar A.* Decellularized liver matrix-modified cryogel scaffolds as potential hepatocyte carriers in bioartificial liver support system and implantable liver constructs. — *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018, **10**, 114.
44. *Sedlačik T., Acar O.K., Studenová H., Kotelnikov I., Kuka J., Koneň Z., Zikmund T., Kaiser J., Kose G.T., Rypáček F.* Chondrogenic potential of macroporous biodegradable cryogels based on synthetic poly( $\alpha$ -amino acids). — *Soft Matter.* 2018, **14**, 228.
45. *Teodorescu M., Bercea M., Morariu S.* Biomaterials of poly(vinyl alcohol) and natural polymers. — *Polym. Revs.*, 2018, **58**, 247.
46. *Boyaci T., Orakdogan N.* Poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate-co-2-acrylamidopropanosulfonic acid)/Laponite nanocomposite hydrogels and cryogels with improved mechanical strength and rapid dynamic properties. — *Appl. Clay Sci.*, 2016, **121–122**, 162.
47. *Hu M., Gu X., Hu Y., Deng Y., Wang C.* PVA\carbon dot nanocomposite hydrogels for simple introduction of Ag nanoparticles with enhanced antibacterial activity. — *Macromol. Mater. Eng.*, 2016, **301**, 1352.

48. *Верная О.И., Шабатин В.П., Нуриддина А.В., Звукова Н.Д., Хватов Д.И., Семенов А.М., Лозинский В.И., Шабатина Т.И., Мельников М.Я.* Криохимический синтез и антибактериальная активность гибридных нанокомпозитов диоксида титана с наночастицами Ag и Cu, включенных в биополимерные криоструктураты. — *Известия РАН, Сер. Хим.*, 2017, № 11, 2152.
49. *Ji L., Qiao W., Zhang Y., Wu H., Miao S., Cheng Z., Gong Q., Liang J., Zhu A.* A gelatin composite scaffolds strengthened by drug-loaded halloysite nanotubes. — *Mater. Sci. Eng., C*. 2017, **78**, 362.
50. *Narayanan K.B., Han S.S.* Dual-crosslinked poly(vinyl alcohol)/sodium alginate/silver nanocomposite beads — a promising antimicrobial material. — *Food Chem.*, 2017, **234**, 103.
51. *Sahiner N., Sagbas S., Sahiner M., Silan C.* P(TA) macro-, micro-, nanoparticle-embedded super porous p(HEMA) cryogels as wound dressing material. — *Mater. Sci. Eng., C*. 2017, **70**, 317.
52. *Mahdavinia G.R., Soleymani M., Etemadi H., Sabzi M.* Model protein BSA absorption onto novel magnetic chitosan/PVA/laponite RD hydrogel nanocomposite beads. — *Internat. J. Biol. Macromol.*, 2018, **107**, 719.
53. *Yang W., Fortunati E., Bertoglio F., Owczarek J.S., Bruni G., Kozanecki M., Kenny J.M., Torre L., Visai L., Puglia D.* Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin nanoparticles. — *Carbohydr. Polym.*, 2018, **181**, 275.
54. *Родионов И.А.* Криогели на основе сывороточного альбумина: синтез, свойства, структура и возможности биомедицинского применения. — *Дис. канд. хим. наук, М.; ИНЭОС РАН*, 2017, 156 с.
55. *Lozinsky V.I., Vainerman E.S., Korotaeva G.F., Rogozhin S.V.* Study of cryostructurization of polymer systems. III. Cryostructurization in organic media. — *Coll. Polym. Sci.*, 1984, **262**, 617.
56. *Лозинский В.И., Дамшкalin Л.Г., Шаскольский Б.Л., Бабушкина Т.А., Курочкин И.Н., Курочкин И.И.* Изучение криоструктурирования полимерных систем. 27. Физико-химические свойства криогелей поливинилового спирта и особенности их макропористой морфологии. — *Коллоидн. журн.*, 2007, **69**, 798.
57. *Никонов В.В., Иванов Р.В., Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И.* Влияние молекулярной массы полимерного предшественника на особенности формирования и свойства ковалентно-сшитых хитозановых криогелей. — *Высокомолекул. соед., А*. 2011, **53**, 2067.
58. *Lozinsky V.I., Damshkaln L.G., Ezernitskaya M.G., Glotova Y.K., Antonov Y.A.* Cryostructuring of polymer systems. 35. Wide pore poly(vinyl alcohol) cryogels prepared using a combination of liquid-liquid phase separation and cryotropic gel-formation processes. — *Soft Matter*. 2012, **8**, 8493.
59. *Папков С.П.* Студнеобразное состояние полимеров. М.: Химия, 1974, 256 с.
60. *Иржак В.И., Розенберг Б.А., Ениколопян Н.С.* Сетчатые полимеры. М.: Наука, 1974. 248 с.
61. *Flory P.J.* Networks. in: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. New York e.a.: J.Wiley & Sons, 1987. V.10. pp.95-112.
62. *Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* Способ получения макропористых полимерных материалов. — *А.с. СССР № 1008214 (1982), В.И. № 12 (1983)*.
63. *Лозинский В.И., Корнеева М.Н., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* Структурообразование при замораживании полимеризующейся системы, состоящей из винильного и дивинильного мономеров. — *Докл. АН СССР*, 1983, **270**, 101.

64. *Lozinsky V.I., Vainerman E.S., Titova E.F., Belavtseva E.M., Rogozhin S.V.* Study of cryostructurization of polymer systems. IV. Cryostructurization of the system: solvent – vinyl monomer – divinyl monomer – initiator of polymerization. – Coll. Polym. Sci., 1984, **262**, 769.
65. *Belavtseva E.M., Titova E.F., Lozinsky V.I., Vainerman E.S., Rogozhin S.V.* Study of cryostructurization of polymer systems. V. Electron microscopic studies of cross-linked polyacrylamide cryogels. – Coll. Polym. Sci., 1984, **262**, 775.
66. *Lozinsky V.I., Vainerman E.S., Ivanova S.A., Titova E.F., Shtil'man M.I., Belavtseva E.M., Rogozhin S.V.* Study of cryostructurization of polymer systems. VI. The influence of the process temperature on the dynamics of formation and structure of cross-linked polyacrylamide cryogels. – Acta Polymerica. 1986, **37**, 142.
67. *Lozinsky V.I., Morozova S.A., Vainerman E.S., Titova E.F., Shtil'man M.I., Belavtseva E.M., Rogozhin S.V.* Study of cryostructurization of polymer systems. VIII. Characteristics features of the formation of cross-linked poly(acrylamide) cryogels under different thermal conditions. – Acta Polymerica. 1989, **40**, 8.
68. *Рогожин С.В., Вайнерман Е.С., Лозинский В.И.* Образование пространственно-сшитых полимерных структур при замораживании реагирующей системы. – Докл. АН СССР. 1982, **263**, 115.
69. *Lozinsky V.I., Vainerman E.S., Rogozhin S.V.* Study of cryostructurization of polymer systems. II. The influence of freezing of reacting mass on the properties of products in the preparation of covalently cross-linked gels. – Coll. Polym. Sci., 1982, **260**, 776.
70. *Никоноров В.В., Иванов Р.В., Кильдеева Н.Р., Булатникова Л.Н., Лозинский В.И.* Синтез криогелей хитозана, сшитого глутаровым альдегидом, и изучение их свойств. – Высокомолекул. соед., А. 2010, **52**, 1436.
71. *Сергеев Г.Б., Батюк В.А., Степанов М.Б., Сергеев Б.М.* Кинетическая модель химических реакций в замороженных растворах. – Докл. АН СССР. 1973, **213**, 891.
72. *Сергеев Г.Б., Батюк В.А.* Реакции в многокомпонентных замороженных системах. – Успехи химии. 1976, **45**, 793.
73. *Луста К.А., Старостина Н.Г., Горкина Н.Б., Филте Б.А., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* Иммунизация клеток *E.coli* в макропористые криогели на основе полиакриламида. – Прикл. биохим. микробиол., 1988, **24**, 504.
74. *Слабова О.И., Никитин Д.И., Лозинский В.И., Кулакова В.К., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* Окисление водорода иммобилизованными в силикагель и криосиликагель клетками олиготрофных бактерий. – Микробиология. 1988, **57**, 940.
75. *Слабова О.И., Никитин Д.И., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* Особенности газового обмена водородных бактерий, иммобилизованных в обычные и криогели сшитого полиакриламида. – Микробиология. 1991, **60**, 23.
76. *Kuyukina M.S., Rubtsova E.V., Ivshina I.B., Ivanov R.V., Lozinsky V.I.* Selective adsorption of hydrocarbon-oxidizing *Rhodococcus* cells in a column with hydrophobized poly(acrylamide) cryogel. – J. Microbiol. Meth., 2009, **79**, 76.
77. *Arvidsson P., Plieva F.M., Savina I.N., Lozinsky V.I., Fexby S., Bulow L., Galaev I.Yu., Mattiasson B.* Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion exchange columns. – J. Chromatogr., A. 2002, **977**, 27.
78. *Arvidsson P., Plieva F.M., Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Mattiasson B.* Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. – J. Chromatogr., A. 2003, **986**, 275.



79. Петренко Ю.А., Петренко А.Ю., Лозинский В.И., Гурин И.В., Горохова Н.А., Волкова Н.А., Сандомирский Б.П. Культивирование стромальных клеток-предшественников в трехмерных носителях. — Трансплантология (Киев). 2007, **9**, 221.
80. Шмаров М.М., Тутыгина И.Л., Лозинский В.И., Токарская Е.А., Народицкий Б.С., Дамикали Л.Г., Иванов Р.В., Лозинский В.И. Способ размножения вируса. — Пат. РФ № 2381272 (2008); Б.И. № 4 (2010).
81. *Lozinsky V.I., Kulakova V.K., Ivanov R.V., Petrenko A.Yu., Rogulska O.Yu., Petrenko Yu.A.* Cryostructuring of polymer systems. 47. Preparation of wide porous gelatin-based cryostructures in sterilizing organic media and assessment of the suitability of thus formed matrices as spongy scaffolds for 3D cell culturing. — *e-Polymers*. 2018, **18**, 175.
82. Михалев О.И., Петров А.Н., Гнездилова Т.В., Лозинский В.И., Алфимов М.В. Способ получения коллагенсодержащего материала. — Пат. РФ № 2008362 (1992); Б.И. № 4 (1994).
83. Лозинский В.И., Гнездилова Т.В. Способ получения губчатого коллагенсодержащего материала. — Пат. РФ № 2053796 (1992); Б.И. № 4 (1996).
84. Лозинский В.И., Родионов И.А., Цишкарашвили А.В., Еськин Н.А. Антибактериальная белковая губка для химиотерапии инфицированных ран и способ ее получения. — Пат. РФ № 2637634 (2016); Б.И. № 34 (2017).
85. Рогожин С.В., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Домотенко Л.В., Мамтис А.М., Иванова С.А., Штильман М.И., Коршак В.В. Нековалентное криоструктурирование в полимерных системах. — Докл. АН СССР, 1984, **278**, 129.
86. *Lozinsky V.I., Vainerman E.S., Domotenko L.V., Mamtsis A.M., Titova E.F., Belavtseva E.M., Rogozhin S.V.* Study of cryostructuring of polymer systems. VII. Structure formation under freezing of poly(vinyl alcohol) aqueous solutions. — *Coll. Polym. Sci.*, 1986, **264**, 19.
87. *Lozinsky V.I., Domotenko L.V., Vainerman E.S., Mamtsis A.M., Rogozhin S.V.* On the possibility of mechanodestruction of poly(vinyl alcohol) molecules under moderate freezing of its concentrated water solutions. — *Polym. Bull.*, 1986, **15**, 333.
88. *Altunina L.K., Kuvshinov V.A., Dolgikh S.N.* Cryogels — a promising material for underground works in permafrost. — in: *Advances in Geological Storage of Carbon Dioxide*. Eds. Lombardi S, Altunina LK, Beaubien SE. Heidelberg: Springer; 2006; NATO Science Series IV: pp. 103–110.
89. *Gutiérrez M.C., Aranaz I., Ferrer M.L., del Monto F.* Production and properties of poly(vinyl alcohol) cryogels: recent developments. — in: *Macroporous Polymers: Production, Properties and Biological/Biomedical Applications*. Eds. Mattiasson B, Kumar A, Galaev I. Boca Raton: CRC Press; 2010. pp.83-115.
90. *Aves M.H., Jensen B.E.B., Smith A.A.A., Zelikin A.N.* Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: new vista on a long serving biomaterial. — *Macromol. Biosci.*, 2011, **11**, 1293.
91. *De Rosa C., Auriemma F., Di Girolamo R.* Kinetic analysis of cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol)/water solutions by small-angle neutron scattering. — *Adv. Polym. Sci.*, 2014, **263**, 159.
92. *Vasiliev N.K., Pronk A.D.C., Shatalina I.N., Janssen F.H.M.E., Houben R.W.G.* A review on the development of reinforced ice for use as a building material in cold regions. — *Cold Reg. Sci. Techn.*, 2015, **115**, 56.
93. *Shakya A.K., Kandalam U.* Three-dimensional macroporous materials for tissue engineering of craniofacial bone. — *Brit. J. Oral Maxillofacial Surg.*, 2017, **55**, 875.
94. *Konstantinova N.R., Lozinsky V.I.* Cryotropic gelation of ovalbumin solutions. — *Food Hydrocoll.*, 1997, **11**, 113.

95. *Tanaka R., Hatakeyama T., Hatakeyama H.* Formation of locust bean gum hydrogel by freezing-thawing. — *Polym. Internat.*, 1998, **45**, 118.
96. *Lozinsky V.I., Damshkaln L.G., Brown C.R.T., Norton I.T.* Study of cryostructuring of polymer systems. XIX. On the nature of intermolecular links in the cryogels of locust bean gum. — *Polym. Internat.*, 2000, **49**, 1434.
97. *Iijima M., Hatakeyama T., Hatakeyama H.* Gelation of cassia gum by freezing and thawing. — *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2013, **113**, 1073.
98. *Lozinsky V.I., Damshkaln L.G., Brown C.R.T., Norton I.T.* Study of cryostructuring of polymer systems. XVIII. Freeze-thaw-influence on water-solubilised artificial mixtures of amylopectin and amylose. — *J. Appl. Polym. Sci.*, 2000, **78**, 371.
99. *Lozinsky V.I., Damshkaln L.G., Brown C.R.T., Norton I.T.* Study of cryostructuring of polymer systems. XXI. Cryotropic gel-formation of the water-maltodextrin systems. — *J. Appl. Polym. Sci.*, 2002, **83**, 1658.
100. *Giannouli P., Morris E.R.* Cryogelation of xantan. — *Food Hydrocoll.*, 2003, **17**, 495.
101. *Podorozhko E.A., Kurskaya E.A., Kulakova V.K., Lozinsky V.I.* Cryotropic structuring of aqueous dispersions of fibrous collagen: The influence of the initial pH values. — *Food Hydrocoll.*, 2000, **14**, 111.
102. *Watase M., Nishinari K., Nambu M.* Anomalous increase in the elastic modulus of frozen poly(vinyl alcohol) gels. — *Cryo-Letters*. 1983, **4**, 197.
103. *Watase M., Nishinari K.* Thermal and rheological properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by repeated cycles of freezing and thawing. — *Makromol. Chem.*, 1988, **189**, 871.
104. *Gusev D.G., Lozinsky V.I., Vainerman E.S., Bakmutov V.I.* Study of the frozen water-poly(vinyl alcohol) system with  $^2\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. — *Magn. Reson. Chem.*, 1990, **28**, 651.
105. *Mikhalev O.I., Serpinski M., Lozinsky V.I., Kapanin P.V., Chkheidze I.I., Alfimov M.V.* Method for the determination of liquid microphase volume: application to the investigation of frozen water-polyvinyl alcohol system. — *Cryo-Letters*. 1991, **12**, 197.
106. *Peppas N.A., Stauffer Sh.R.* Reinforced uncross-linked poly(vinyl alcohol) gels produced by cyclic freezing-thawing processes: a short review. — *J. Contr. Release*. 1991, **16**, 305.
107. *Stauffer Sh.R., Peppas N.A.* Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing. — *Polymer*. 1992, **33**, 3932.
108. *Hyon S.H., Cha W.I., Ykada Y.* Preparation of transparent poly(vinyl alcohol) hydrogel. — *Polym. Bull*. 1989, **22**, 119.
109. *Masuda K., Horii F.* CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of the chain conformation and hydrogen bonding for frozen poly(vinyl alcohol) solutions. — *Macromolecules*. 1998, **31**, 5810.
110. *Лозинский В.И., Леонова И.М., Иванов Р.В., Бакеева И.В.* Изучение криоструктурирования полимерных систем. 46. Физико-химические свойства и микро-структура криогелей поливинилового спирта, сформированных из растворов полимера в смесях диметилсульфоксида с низкомолекулярными спиртами. — *Коллоидн. журн.*, 2017, **79**, 756.
111. *Eliasson A.C., Kim H.R.* Changes in rheological properties of potato starch pastes during freeze-thaw treatments. I. A Rheological approach for evaluation of freeze-thaw stability. — *J. Texture Stud.*, 1992, **23**, 279.
112. *Ferrero C., Martino M.N., Zaritzky N.E.* Stability of frozen starch paste: effects of freezing, storage and xanthan gum addition. — *J. Food. Proc. Preserv.*, 1993, **17**, 191.
113. *Лозинский В.И., Дамшкalin Л.Г., Плиева Ф.М., Галаев И.Ю., Маттиассон Б.* Полимерная композиция для получения макропористого агарозного геля и способ его получения. — Пат. РФ № 2220987 (2001); Б.И. № 1 (2004).

114. Bloch K., Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Yavriyanz K., Vorobeychik M., Azarov D., Damshkaln L.G., Mattiasson B., Vardi P. Functional activity of insulinoma cells (INS-1E) and pancreatic islets cultured in agarose cryogel sponges. — J. Biomed. Mater. Res., A. 2005, **75**, 802.
115. Lozinsky V.I., Damshkaln L.G., Bloch K.O., Vardi P., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Ya. Cryostructuring of polymer systems. XXIX. Preparation and characterization of supermacroporous (spongy) agarose-based cryogels used as three-dimensional scaffolds for culturing insulin-producing cell aggregates. — J. Appl. Polym. Sci., 2008, **108**, 3046.
116. Евтюгин В.Г., Маргулис А.Б., Дамшкaлн Л.Г., Лозинский В.И., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Сорбция микроорганизмов крупнопористыми агaрозными криогелями, содержащими привитые алифатические цепи различной длины. — Микробиология. 2009, **78**, 667.
117. Yokoyama F., Masada I., Shimamura K., Ikawa T., Monobe K. Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting. — Coll. Polym. Sci., 1986, **264**, 595.
118. Willcox P.J., Howie D.W., Schmidt-Rohr K., Hoagland D.A., Gido S.P., Pudjijanto S., Kleiner W., Venkatraman S. Microstructure of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by freeze/thaw cycling. — J. Polym. Sci. B: Polym. Phys., 1999, **37**, 3438.
119. В.И.Лозинский В.И., Дамшкaлн Л.Г., Курочкин И.Н., Курочкин И.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 28. Физико-химические свойства и морфология криогелей поливинилового спирта, сформированных многократным замораживанием-оттаиванием. — Коллоидн. журн., 2008, **70**, 212.
120. Mori Y., Tokura H., Yoshikawa M. Properties of hydrogels synthesized by freezing and thawing aqueous polyvinyl alcohol solutions and their applications. — J. Mater. Sci., 1997, **32**, 491.
121. Домотенко Л.В., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В. Влияние режимов замораживания водных растворов поливинилового спирта и условий размораживания образцов на свойства получающихся при этом криогелей. — Высокомолекул. соедин., А., 1988, **30**, 1661.
122. Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Домотенко Л.В., Бломенфельд А.Л., Рогов В.В., Барковская Е.Н., Федин Э.И., Рогожин С.В. Характерные особенности замерзания концентрированных водных растворов поливинилового спирта; взаимосвязь со свойствами гидрогелей, получающихся после оттаивания. — Коллоидн. журн., 1989, **51**, 685.
123. Лозинский В.И., Дамшкaлн Л.Г., Курочкин И.Н., Курочкин И.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 33. Влияние скорости охлаждения водных растворов поливинилового спирта при их замораживании на физико-химические свойства и пористую морфологию криогелей, получающихся после оттаивания. — Коллоидн. журн., 2012, **74**, 343.
124. Лозинский В.И., Домотенко Л.В., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В. Некоторые термомеханические свойства криогелей поливинилового спирта. — Высокомолекул. соедин., А. 1989, **31**, 1805.
125. Kobayashi M., Chang Y., Oka M. A two year in vivo study of poly(vinyl alcohol) hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. — Biomaterials. 2005, **26**, 3243.
126. Joshi A., Fussell G., Thomas J., Hsuan A., Lowman A., Karduna A., Vresilovic A., Marcolongo M. Functional compressive mechanics of a PVA/PVP nucleous pulposus replacement. — Biomaterials. 2006, **27**, 176.

127. *Swieszkowski W., Ku D., Bersee H., Kurzydowski K.* An elastic material for cartilage replacement in an arthritic shoulder joint. — *Biomaterials*. 2006, **27**, 1534.
128. *Bodugoz-Senturk H., Macias C.E., Kung J.H., Muratoglu O.K.* Poly(vinyl alcohol)-acrylamide hydrogels load-bearing cartilage substitute. — *Biomaterials*. 2009, **30**, 589.
129. *Li J.K., Wang N., Wu X.S.* Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing-thawing process for protein/peptide drug delivery. — *J. Control. Release.*, 1998, **56**, 117.
130. *Shaheen S., Yamaura M.* Preparation of theophylline hydrogels of atactic poly(vinyl alcohol)/NaCl/H<sub>2</sub>O system for drug delivery system. — *J. Control. Release.*, 2002, **81**, 367.
131. *Nugent M., Hanley A., Tomkins P., Higginbotham C.* Investigation of novel freeze-thaw process for the production of drug delivery hydrogels. — *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, 2005, **16**, 1149.
132. *Niknia N., Kadkhodae R.* Gum tragacanth-polyvinyl alcohol cryogel and xerogel blends for oral delivery of silymarin: structural characterization and mucoadhesive property. — *Carbohydr. Polym.*, 2017, **177**, 315.
133. *Wan W., Campbell G., Zhang Z., Hui A., Boughner D.* Optimizing of tensile properties of poly(vinyl alcohol) hydrogel for the construction of a bioprosthetic heart valve stent. — *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, **63**, 584.
134. *Jiang H., Campbell G., Boughner D., Wan W., Quantz M.* Design and manufacture of a poly(vinyl alcohol) (PVA) cryogel tri-leaflet heart valve prosthesis. — *Med. Eng. Phys.*, 2004, **26**, 269.
135. *Millon L.E., Mohammadi H., Wan W.K.* Anisotropic poly(vinyl alcohol) hydrogel for cardiovascular applications. — *J. Biomed. Mater. Res., B*. 2006, **79**, 305.
136. *Millon L.E., Nieh M., Hutter J.L., Wan W.* SANS characterization of an anisotropic poly(vinyl alcohol) hydrogel with vascular applications. — *Macromolecules*. 2007, **40**, 3655.
137. *Holloway J.L., Spiller K.L., Lowman A.M., Palmese G.R.* Analysis of a in vitro swelling behavior of poly(vinyl alcohol) hydrogels in osmotic pressure solution for soft tissue replacement. — *Acta Biomater.*, 2011, **7**, 2477.
138. *Hoskins P.R.* Simulation and validation of arterial ultrasound imaging and blood flow. — *Ultrasound Med. Biol.*, 2008, **34**, 693.
139. *Augst A.D., Kong H.J., Mooney D.J.* Alginate hydrogels as biomaterials. — *Macromol. Biosci.*, 2006, **6**, 623.
140. *Yuryev V.P., Grinberg N.V., Braudo E.E., Tolstoguzov V.B.* A study of the boundary conditions for the gel formation of alginates of polyvalent metals. *Starch/Stärke*. 1979, **31**, 121.
141. *Smidströd O., Skjak-Bræk G.S.* Alginate as immobilization matrix for cells. — *Trends in Biotech.*, 1990, **8**, 71.
142. *Вайнерман Е.С., Лозинский В.И., Рогожин С.В., Раскина Л.П., Шапиро Л.А., Якубович В.С., Бронштейн Б.Ю.* Способ получения пористого альгинатного материала. — А.с. СССР № 1171474 (1983); Б.И. № 29 (1985).
143. *Лозинский В.И., Сименел И.А., Чебышев А.В.* Способ получения пористого материала. — Пат. РФ № 2035476 (1994); Б.И. № 14 (1995).
144. *Лозинский В.И., Зубов А.Л.* Способ получения макропористого полимерного материала. — Пат. РФ № 2078099 (1994); Б.И. № 12 (1997).
145. *Petrenko Yu.A., Ivanov R.V., Petrenko A.Yu., Lozinsky V.I.* Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells. — *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, 2011, **22**, 1529.

146. Лозинский В.И., Звукова Н.Д., Иванов Р.В., Колосова Е.Ю., Кулакова В.К., Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Подорожко Е.А., Родионов И.А., Роговская Е.Ю., Рябов А.Н., Смилицкая Е.С., Цискарашвили А.В. Какие возможности для создания новых полимерных материалов биомедицинского назначения открывает использование приемов криоструктурирования. — Тез. докл. VII Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2017», Москва, РФ, 13–17.06.2017, С.225.
147. [www.palma-med.ru](http://www.palma-med.ru)
148. Вайнерман Е.С., Лозинский В.И., Рогожин С.В., Раскина Л.П., Шапиро Л.А., Якубович В.С., Шенкер М.Б., Комисарова А.Л., Потапов В.Д., Гудочкова В.М., Атясова Н.М., Иванова Г.А. Способ получения пористого материала, обладающего ранаживляющим действием. — А.с. СССР № 1171476 (1983); Б.И. № 29 (1985).
149. Shapiro L., Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. - *Biomaterials*. 1997, **18**, 581.
150. Glicklis R., Shapiro L., Agbaria R., Merchuk J.C., Cohen S. Hepatocyte behavior within three-dimensional alginate scaffold. — *Biotechn. Bioeng.*, 2000, **67**, 344.
151. Cohen S., Leor J. Rebuilding broken hearts. — *Sci. Amer.*, 2004, № 11, 44.
152. Dvir-Ginzberg M., Konson A., Cohen S., Agbaria R. Entrapment of retroviral vector producer cells in three-dimensional alginate scaffolds for potential use in cancer gene therapy. — *J. Biomed. Mater. Res.*, В. 2007, **80**, 59.
153. Петренко Ю.А., Иванов Р.В., Лозинский В.И., Петренко А.Ю. Сравнительное исследование методов заселения широкопористых носителей на основе альгинатного криогеля мезенхимальными стромальными клетками костного мозга человека. — *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2010, № 4, 225.
154. Петренко Ю.А., Катцен-Глоба А., Мейзер И., Иванов Р.В., Лозинский В.И., Циммерманн Х., Петренко А.Ю. Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток в широкопористых объемных альгинат-желатиновых носителях. — *Пробл. криобиол. криомед.*, 2013, **23**, 351.
155. Katsen-Globa A., Meiser I., Petrenko Yu.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Zimmermann H., Petrenko A.Yu. Towards a ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds. — *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, 2014, **25**, 857.
156. Грицай Д.В., Лебединский А.С., Оченашко О.В., Роговская Е.Ю., Петренко Ю.А., Лозинский В.И., Иванов Р.В., Петренко А.Ю. Трансплантация криоконсервированных клеток фетальной печени, засеянных в макропористые альгинат-желатиновые матрицы, крысам с печеночной недостаточностью. — *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2015, **XVII**, 50.
157. Ho M.H., Kuo P.Y., Hsieh H.J., Hsieh T.Y., Hou L.T., Lai J.Y., Wang D.M. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. — *Biomaterials*. 2004, **25**, 129.
158. Berillo D., Mattiasson B., Kirsebom H. Cryogelation of chitosan using noble-metal ions: in situ formation of nanoparticles. — *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 2246.

## Глава 4

# Экспериментальные подходы к получению белковых криогелей и криоструктуратов

*Родионов И.А.<sup>1</sup>, Синицкая Е.С.<sup>1</sup>, Иванов Р.В.<sup>1</sup>, Цискаришвили А.В.<sup>2</sup>, Лозинский В.И.<sup>1</sup>*

В современной биомедицинской практике и для биотехнологических целей используется большое количество самых разнообразных полимерных материалов, а также лекарственных форм, изготовленных в основном из или с добавками веществ белковой природы [1–9]. В частности, известны различные губчатые матрицы, включая и губки на основе веществ белковой природы, которые применяют при лечении ран и ожогов. Эти гетерофазные макропористые губки имеют общее специфическое свойство — выраженную сорбционную способность по отношению к жидкому экссудату, выделяемому раной или ожогом. Примерами белковых материалов такого типа являются гемостатические коллагеновые губки [10]. Как правило, абсорбционная способность подобных покрытий на раны и ожоги обусловлена системой капилляров, пронизывающих хорошо смачиваемую биологической жидкостью полимерную матрицу. При этом растворимые вещества, если таковые первоначально входили в состав таких губок, например кровоостанавливающие агенты, высвобождаются в жидкую фазу. Подобные крупнопористые материалы наиболее эффективны в случаях, когда необходимо быстро обеспечить высокую терапевтическую дозу лекарства, поскольку у них основная транспортная функция обеспечивается не медленной диффузией, как у однофазных гелевых матриц, а конвекцией жидкости по системе сообщающихся пор капиллярного размера. Также широкопористые гелевые материалы, в том числе и сформированные из белков, имеют важное значение для клеточных технологий и тканевой инженерии, когда подобные (био)полимерные матрицы используются в качестве носителей или подложек (англоязычный термин — scaffolds) при культивировании клеток и создании тканеинженерных конструкций

---

<sup>1</sup> Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской Академии наук.

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, МЗ РФ.

[11–14]. Конечно, этими примерами не исчерпывается все многообразие вариантов применения макропористых белковых матриц для медицинских и биотехнологических цепей, тем более что постоянно в научной и патентной литературе появляются сообщения о новых разработках.

Придание подобным материалам макропористой морфологии без потери ими необходимого комплекса прочностных и эксплуатационных характеристик — одна из ключевых задач при разработке соответствующих «изделий». Для этих целей применяют различные приемы, в частности, жидкофазное расслоение [15, 16], вспенивание [17], введение дисперсных пороенов, которые могут быть проэкстрагированы из массы геля после его формирования [18, 19], криотропное гелеобразование [20, 21], сублимационная сушка [22, 23] и др. В последних двух случаях, подробно рассматриваемых в отдельном разделе этой книги [24], функцию порообразователя выполняют поликристаллы замерзшего растворителя (т. е. поликристаллы льда, если речь идет о замороженных водных молекулярных или коллоидных растворах предшественников формируемого материала). При этом, если собственно гелеобразование, т. е. образование трехмерной полимерной сетки, происходит в неглубоко замороженной системе, а именно в объеме так пазываемой пезамерзшей жидкой микрофазы (НЖМФ) [20, 25], то после оттаивания получают макропористые гелевые матрицы, обозначаемые термином *криогели* [26–28]. Если же такое гелеобразование не протекает, а кристаллическую фазу замороженного растворителя удаляют сублимацией (лиофилизацией) или криоэкстракцией, то такая последовательность операций приводит к макропористым полимерным материалам, называемым *криоструктурами* [21, 29–32].

Лиофилизация или же криоэкстракция льда из замороженных водных систем, содержащих биополимерные предшественники, приводит к удалению из двухфазной системы поликристаллов замерзшего растворителя, в то время как белковые компоненты формируют стенки макропор образующегося пористого белкового лиофилизата. Данный прием используется в практике получения широкопористых матриц на белковой основе, причем процесс может дополнительно включать стадию стабилизации сформированного губчатого материала с помощью сшивки биополимерного предшественника как ковалентно, например под действием сшивающих агентов в среде нерастворителя белка, так и нековалентно с помощью внешнего воздействия, приводящего к дополнительной структуризации белка в стенках макропор его лиофилизата. Иными словами, при криотропном гелеобразовании формирование узлов пространственной гелевой сетки криогелей протекает в процессе замораживания, а в случае криоструктуратов — после криогенной обработки. Вполне логично, что в практике применяется еще и третий вариант последовательности опе-

раций, в котором на начальном этапе в реакционной системе проводят гелеобразование с формированием узлов пространственной гелевой сетки (ковалентных или нековалентных), а затем полученный гель подвергают криоструктурированию замораживанием и лиофильным высушиванием. В табл. 4.1 приведена классификация всех вышеперечисленных вариантов получения криогенно-структурированных белковых матриц.

**Таблица 4.1.** Классификация гетерофазных криогенно-структурированных белковых матриц по способу их получения

Тип гелевой системы	Стадия формирования узлов пространственной гелевой сетки	Способ удаления замороженного растворителя	Литература
Криогели	В процессе проведения криогенной обработки исходной белковой системы при заданной отрицательной температуре	размораживание	[20, 21, 27–29]
Криоструктураты 1-го типа	После проведения криогенной обработки исходной белковой системы	лиофилизация; криоэкстракция	[21, 29, 31, 32]
Криоструктураты 2-го типа	До проведения криогенной обработки исходной белковой системы	лиофилизация	[32, 33]

Макропористая морфология белковых криогелей и криоструктуратов делает перспективным их применение в качестве эффективных носителей иммобилизованных ферментов, клеток микроорганизмов, в качестве подложек для объемного культивирования клеток животных и человека, а также для дальнейшего применения таких гибридных материалов «подложка-клетки» в тканевой инженерии [34–37]. Также белковые криогенно-структурированные матрицы все чаще привлекают внимание исследователей в качестве медицинских материалов и как носители лекарственных средств [38, 39]. Некоторые конкретные варианты подобных систем рассматриваются ниже.

Различные белки, например коллаген, фиброин шелка, кератин, фибронектин, альбумины, фибрин, желатин и др. — биологические макромолекулы, которые, как хорошо известно [40], в соответствии с простейшей структурной классификацией разделяют на три группы: 1) фибриллярные белки, 2) глобулярные белки и 3) белки с неупорядоченной конформацией статистического «клубка». Поскольку разная конформация белковых



предшественников сильно влияет на свойства получаемых на их основе криогенно-структурированных материалов, то каждый тип таких систем далее обсуждается отдельно.

## 4.1. Криогели и криоструктураты на основе фибриллярных белков

Макромолекулы фибриллярных белков имеют вытянутую нитевидную конформацию и характеризуются высокоорганизованным регулярным взаиморасположением в пространстве отдельных участков полипептидных цепей. В живых организмах белки данного класса входят в состав соединительных тканей, характеризующихся сравнительно высокой механической прочностью, выполняющих опорную и защитную функцию [41]. Это обстоятельство предполагает использование фибриллярных белков в качестве предшественников для получения белковых криогелей, устойчивость к механическим нагрузкам которых сопоставима с материалами на основе синтетических высокомолекулярных соединений. Такие прочные и в то же время обладающие губчатой морфологией криогели на основе фибриллярных белков могут быть рекомендованы для использования в качестве имплантов для регенерации или замены костной и хрящевой тканей [39, 42].

В литературе имеется описание криогелей на основе коллагена — фибриллярного белка, составляющего основу соединительной ткани в животных организмах. Известно 28 типов коллагена, отличающихся молекулярной массой и аминокислотной последовательностью [43]. При получении криогелей на основе данного белка часто используют коллаген, выделенный из сухожилий или кожи различных животных, например свиней, крупного рогатого скота или рыб. В виду нерастворимости коллагена в воде криогели на его основе, как правило, получают из водных суспензий, содержащих микроволокна данного белка и растворенный кросс-агент. Например, в качестве последнего в работе [44] был использован диальдегид крахмала (продукт частичного окисления крахмала периодатом натрия), который добавляли в суспензии тропоколлагена, с последующей криогенной обработкой полученной реакционной системы при  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 72 ч. В результате сшивки тройных спиралей коллагена по первичным аминогруппам с образованием межмолекулярных альдиминных связей формировалась пространственная полимерная сетка полимерной фазы криогеля (рис. 4.1) [30], а кристаллы замерзшего льда выполняли функцию порогена.

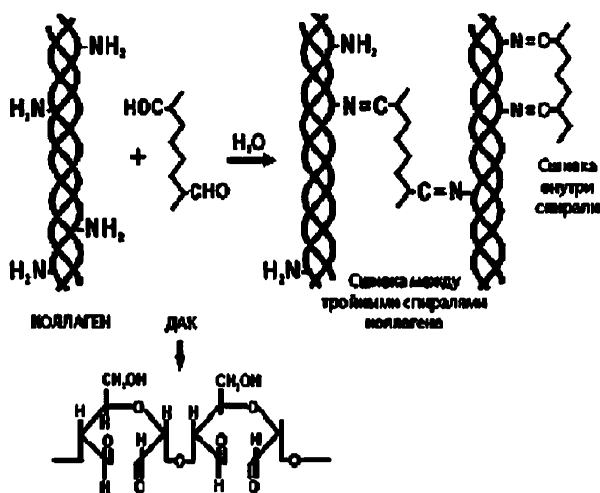


Рис. 4.1. Схема взаимодействия тропоколлагена и диальдегида крахмала [30]

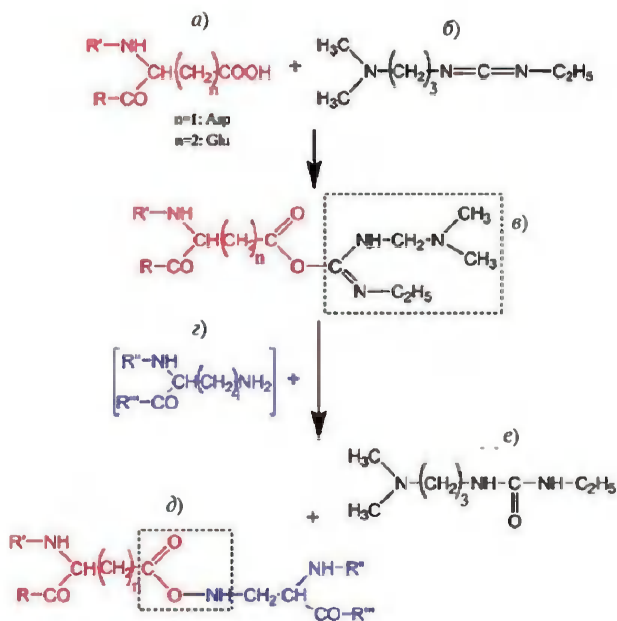
Варьирование содержания сшивающего агента в исходном растворе в интервале от 0,002 до 0,1 масс.% приводило к некоторому ожидаемому снижению степени набухания формировавшихся криогелей, а также вызывало повышение температуры денатурации коллагена в составе полимерной матрицы на 10–15 °С, что является следствием роста жесткости гелевой сетки таких криогелей за счет более частой сшивки.

По схожей методике были получены коллагеновые криогели [45] с применением в качестве сшивающего агента диальдегида карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Поскольку данный кросс-агент имеет значительную молекулярную массу (вязкость 2%-ного раствора КМЦ  $\geq 1200$  мПа·с), замороженную при –20 °С водную суспензию коллагена и диальдегида КМЦ инкубировали в таком состоянии 5 суток. Повышение содержания кросс-агента в исходной системе от 0,001 до 0,01 мг/мл приводило, во-первых, к снижению равновесной степени набухания получаемых коллагеновых криогелей с 90 до 45 г воды/г полимера за счет формирования более часто сшитой гелевой сетки, а также способствовало снижению скорости свертывания крови при испытаниях данных криогелей *in vitro*, что объяснялось авторами сокращением числа свободных NH<sub>2</sub>-групп в составе коллагена, влияющих на коагуляцию крови.

Для придания коллагеновым криогелям дополнительных прочностных, антибактериальных и других специфических свойств в исходную реакционную систему в качестве армирующей добавки часто вводят дополнительные компоненты, например другие полимеры или твердые частицы, в частности, суспензию наночастиц гидроксиапатита, способствующего ро-

сту костной ткани [46]. Так, в работе [47] для регенерации поврежденной костной ткани предложены ковалентно-сшитые коллагеновые криогели с улучшенными прочностными характеристиками, содержащие частицы такого наполнителя. Для этого в исходную водную суспензию микроволокон коллагена и минеральных частиц перед замораживанием ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) вносили смесь 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (ЭДК) и N-гидрохлоридсукцинимиды.

Особенность сшивающих агентов карбодиимидного типа, наиболее часто используемым примером которых как раз и является ЭДК, заключается в том, что данное соединение участвует в образовании амидной связи между боковыми карбоксильными и аминогруппами белковых предшественников (рис. 4.2) [30], не встраиваясь при этом в формирующуюся гелевую сетку, стабилизированную «сшивками нулевой длины», т. е. межмолекулярный ковалентный узел полимерной сетки не содержит остатков сшивателя [48].



**Рис. 4.2.** Общая схема реакций образования межмолекулярных пептидных связей с помощью ЭДК ( $R$  и  $R'$  — сегменты полипептидной цепи одной молекулы белка,  $R''$  и  $R'''$  — сегменты полипептидной цепи другой молекулы белка) [30]

С ростом содержания частиц наполнителя средний диаметр пор и степень разброса значений этого диаметра для таких композитных криогелей уменьшались. Также повышение содержания наполнителя в этих компо-

зитных коллагеновых матрицах приводило к росту модуля упругости получаемого материала от 12 до 43 ГПа и снижению степени набухания с 58 до 18 г воды/г полимера. Испытания *in vitro* полученных композиционных материалов показали их хорошую биосовместимость с клетками остеобластов.

Описан и более сложный с точки зрения методики синтеза пример получения биоразлагаемых коллагеновых криоструктуратов для целей регенеративной медицины путем сшивки белка с помощью ЭДК [49]. На начальном этапе дисперсию микроволокон коллагена в водном растворе альгината натрия замораживают при  $-20^{\circ}\text{C}$  и высушивают лиофильно, после чего полученный пористый лиофилизат погружают в раствор ЭДК при pH 5,5. Затем в данную систему для улучшения биосовместимости и антибактериальных свойств образующегося криоструктурата вносят хитоолигосахарид с целью дополнительной модификации стенок макропор губчатого материала. При этом показано, что повышение молекулярной массы используемого хитоолигосахариды от 1 до 10 кДа приводит к уменьшению среднего диаметра макропор от 250 до 150 мкм, а также к росту модуля упругости получаемых коллагеновых матриц от 2,5 до 11,3 МПа.

В случае криоструктуратов на стадии ковалентной сшивки пористого лиофилизата в среде нерастворителя биополимера могут быть использованы любые подходящие кросс-агенты, не реагирующие с растворителем. Например, губчатые лиофилизаты, полученные замораживанием при одной из температур в диапазоне  $-20 \dots -60^{\circ}\text{C}$  водных суспензий смеси коллагена человека с хитозаном и последующей сублимационной сушкой, далее сшивали обработкой раствором проантоцианидина в фосфатном буфере (pH = 6,8) с добавкой 30% этанола [50]. Проантоцианидин относится к группе природных флавоноидов [51], и его структура включает эпикатехиновый фрагмент, орто-фенольные группы которого способны образовывать прочные водородные связи с атомами кислорода амидных связей в составе полипептидных цепей коллагена, что в результате приводит к их межцепной сшивке. Средний диаметр пор губчатых нерастворимых в воде коллагеновых криоструктуратов, полученных в результате такой обработки лиофилизата, составляет 104–122 мкм и тем меньше, чем ниже была температура замораживания исходной смеси биополимерных предшественников, поскольку при этом образуются меньшие по размеру частицы порога, т. е. поликристаллы льда.

В перечень факторов, влияющих на параметры пористости подобных коллагеновых криоструктуратов, входит не только температура замораживания образцов, но и обуславливающий условия теплопередачи материал, а также геометрия сосуда/формы, куда помещена исходная суспензия микроволокон коллагена. Увеличение площади охлаждаемой поверхности приводит к формированию пористой структуры, менее однородной в от-

ношении диаметра и формы макропор [52]. Кроме того, средний диаметр пор коллагеновых криоструктуратов тем больше, чем продолжительнее стадия инкубации образцов в замороженном состоянии, а анизотропия размеров пор по высоте возрастает в направлении вверх от охлаждаемой поверхности. Такой же эффект часто наблюдается для криогенно-структурированных полимерных матриц, формируемых градиентным замораживанием исходных систем [53].

Фиброин шелка является еще одним фибриллярным белком, часто используемым в качестве биополимерного предшественника для получения криогелей и криоструктуратов биомедицинского назначения в виду биосовместимости фиброина, повышенных прочностных свойств, потенциальной биоразлагаемости. В частности, на основе фиброина шелка созданы губчатые криогели и криоструктураты, успешно опробованные в качестве материалов для тканевой инженерии [54, 55]. Чистый фиброин получают из шелка, продуцируемого насекомыми, и по причине большей производительности и лучшего качества материала наиболее часто для этой цели используют шелк, вырабатываемый шелковичными червями, в особенности тутовым шелкопрядом (*Bombix mori*). Дегуммированием шелка (например, кипячением шелка в щелочной среде [56]) производят фиброин, не содержащий серицина — еще одного белкового компонента шелка [57]. Фиброин является олигомерным белком, макромолекулы которого состоят из тяжелой и легкой полипептидных цепей, соединенных дисульфидной связью и также нековалентно связанных с гликопротеином, который выполняет роль стабилизатора этого полипептидного ансамбля. Макромолекула фиброина обладает вытянутой конформацией, состоящей из повторяющихся гидрофобных нанокристаллитов, образованных  $\beta$ -складками, и гидрофильных аморфных блоков в конформации «клубка», образованных объемными полярными боковыми цепями. Гидрофобные домены придают белку механическую прочность, в то время как гидрофильные области обуславливают сродство белка к воде и его высокоэластические характеристики.

Среди способов получения широкопористых структуратов на основе фиброина шелка можно выделить такие методы, как встраивание частиц порогена, которые могут быть удалены из материала после завершения гелеобразования с помощью соответствующего растворителя [58], вспенивание [54], а также, как и в случае с коллагеновыми криоструктуратами, формирование пористой структуры лиофильной сушкой замороженной суспензии или раствора белка. Для придания криоструктуратам водонерастворимости их после сублимации льда дополнительно подвергают фиксации как с помощью физического воздействия, приводящего к изменению конформации белка, так и ковалентной сшивкой фиброина сшива-

ющими агентами в среде нерастворителя белка [59]. Например, известно, что воздействие на фиброин низкомолекулярных спиртов приводит к кристаллизации аморфных доменов макромолекул данного белка через образование  $\beta$ -складок [54]. Лиофилизация замороженных ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) водных растворов фиброина (4–12 масс.%) и последующая инкубация полученных криоструктуратов в метаноле приводит к получению фиброиновых губок, средний размер пор у которых от  $150 \pm 40$  до  $81 \pm 61$  мкм, при этом поры тем меньше, чем выше начальная концентрация фиброина [60]. Этот эффект связан с утолщением стенок пор в результате криоконцентрирования белка при замораживании исходных растворов и их лиофилизации.

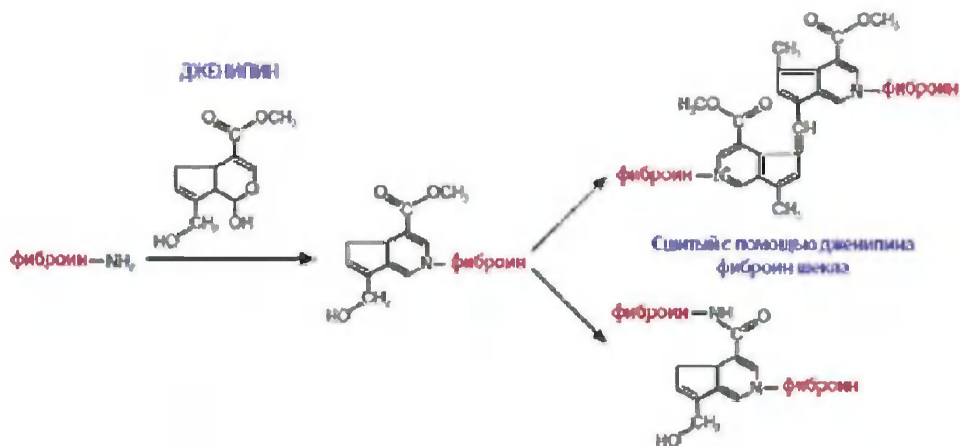
Что касается криогелей на основе фиброина, т. е. макропористых фиброин-содержащих гелей, чье образование происходило в замороженной среде, то такие примеры тоже известны. Так, предварительная ультразвуковая обработка 4,5%-ного водного раствора данного фибриллярного белка, вызывающая частичную денатурацию фиброина, и последующее замораживание такого раствора при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч приводило после оттаивания системы к получению губчатых физических (т. е. нековалентных) криогелей с модулем упругости порядка 140 кПа и средним диаметром пор около 150 мкм [61].

В том же диапазоне находится диаметр пор фиброиновых криогелей, узлы трехмерной сетки которых сшиты химически. Например, в результате замораживания ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 24 ч) водных растворов белка с концентрацией 5, 12 или 18%, содержавших диэпоксидный кросс-агент — диглицидиловый эфир этиленгликоля, сшивающий макромолекулы фиброина по аминокетильным группам звеньев лизина, образуются губчатые ковалентно-сшитые криогели [42]. Диаметр их макропор, как оказалось, зависит от исходных концентраций белка и диэпоксида, а также температуры криогенной стадии синтеза: чем выше исходная концентрация предшественников и ниже температура замораживания, тем мельче образующиеся поры в таких губчатых материалах. Эта тенденция характерна и для других криогелей и криоструктуратов, сформированных из различных фибриллярных белков [50, 52, 54, 60–64].

При синтезе ковалентных белковых криогелей и криоструктуратов биомедицинского назначения предпочтение отдают нетоксичным сшивающим агентам, желателно, природного происхождения (см., например, [45, 50]). В последнее время все большей популярностью для этих целей пользуется дженипин (genipin) — метил-(1R,2R,6S)-2-гидрокси-9-(гидроксиметил)-3-оксабицикло-[4.3.0.]нона-4,8-диен-5-карбоксилат) (рис. 4.3) [30], выделяемый из плодов растения *Gardenia jasminoides Ellis* [65].

Например, сухой кросс-агент добавляют к водному раствору фиброина и после растворения полученную смесь замораживают ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 48 ч),

а затем, не оттаивая, высушивают лиофильно [39]. При этом степень набухания сшитых дженипином криогелей составляет порядка 30 г воды/г полимера, что сопоставимо с набухаемостью фиброиновых криогелей, сшитых диэпоксидом [42], и в 10 раз превышает степень набухания нековалентного криогеля, полученного криогенной обработкой белковой системы, предварительно подвергнутой действию ультразвука [61]. Испытания на биodeградируемость ковалентных криогелей, сшитых дженипином, показали, что образец теряет от 25 до 35% веса при инкубации в течение 21 дня в растворе панкреатической эластазы или экссудата раны, что существенно медленнее разложения *in vitro* нековалентных фиброиновых криоструктуратов, при обработке раствором протеазы теряющих до 80% веса в течение суток [63].



**Рис. 4.3.** Структурная формула дженипина и предполагаемые пути его взаимодействия с макромолекулами фиброина с образованием пространственной гелевой сетки [30]

Криогели и криоструктураты на основе фиброина по своим прочностным свойствам сравнимы с хрящевой тканью [42, 58], а также являются биоразлагаемыми, что позволяет применять их в тканевой инженерии в качестве матриц для регенерации костной и мягких тканей. Известны примеры использования фиброиновых криоструктуратов и криогелей в качестве пористых подложек для культивирования стромальных клеток костного мозга [60], хондроцитов [64], фибробластов кожи [39], амфиотических мультипотентных стволовых клеток [63]. Во всех случаях клетки хорошо прикрепляются к стенкам широкопористых белковых материалов и пролиферируют. Кроме того, сшитые дженипином фиброиновые криогели, нагруженные антибиотиками, предложены и в качестве повязок на инфицированные раны [63].

Также известны белковые криогели, полученные с использованием и других фибриллярных белков, в частности, эластина [39] ламинина [66] и кератина [67]. Например, эластин в комбинации с фиброином шелка использован для получения губчатых криогелей, сшитых с помощью дженипина. При повышении содержания эластина в исходной композиции от 1 до 2% пористость формируемых криогелей увеличивается от 85 до 95%, также несколько возрастают степень набухания губок и скорость их био-разложения под действием панкреатической эластазы или эксудата раны.

\* \* \*

Таким образом, из изложенной в данном разделе информации очевидно, что приемы криоструктурирования полимерных систем позволяют получать широкую гамму макропористых биополимерных матриц на основе различных фибриллярных белков. Очень часто стенки пор в таких криогелях и криоструктуратах имеют микроволокнистое строение, придающее им хорошую эластичность в сочетании с достаточностью прочностью. Эти свойства, наряду с биосовместимостью и, при необходимости, биоразлагаемостью, определяют высокой прикладной потенциал подобных белковых материалов, главным образом, в биомедицинских областях.

Особенно это касается коллагеновых губок, формируемых в замороженных средах как ковалентным сшиванием белковых цепей с помощью соответствующих реагентов, например глутарового альдегида [68], так и за счет нековалентных взаимодействий [69]. Известными примерами биомедицинских материалов такого типа являются гемостатические коллагеновые губки, в частности, коммерчески доступные препараты «Комбутек», «Метуракол», «Тромбокол» и др. [70, 71]. Как правило, абсорбционная способность подобных покрытий на раны и ожоги обусловлена системой капилляров, пронизывающих хорошо смачиваемую биологической жидкостью криогенно-структурированную полимерную матрицу.

## 4.2. Криогели и криоструктураты на основе глобулярных белков

Глобулярные белки, имеющие компактную сферообразную конформацию макромолекул, широко представлены у всех классов живых существ нашей планеты, начиная от самых простых форм (вирусы) и вплоть до органов и тканей человека [40]. Такие белки животного происхождения обладают разнообразными функциями в организмах: ферментативной, регуляторной, транспортной, структурообразующей и др. В частности, глобулярные



белки класса альбуминов благодаря доступности и относительной простоте выделения часто используют в качестве биополимерных предшественников при получении широкопористых белковых криогелей и криоструктуратов. Операционно их получение мало чем отличается от методик, описанных выше для фибриллярных белков.

Так, известны примеры формирования физических и ковалентно-сшитых криогелей на основе альбумина яичного белка – овальбумина. Впервые эффект криотропного гелеобразования овальбумина под действием денатурирующего агента описан в работах [72, 73], где показано, что криогенная обработка 0,25–5%-ных растворов этого белка, содержавших хаотропный агент – мочевины (0,125–5,0 моль/л), приводит к формированию губчатых овальбуминовых криогелей, пространственная полимерная сетка которых стабилизирована за счет в основном нековалентных гидрофобных взаимодействий между определенными участками полипептидных цепей. Варьирование температуры замораживания исходных смесей в диапазоне от  $-8$  до  $-32$  °С практически не сказывается на величине выхода гелефракции (порядка 90%). В свою очередь, на криотропное гелеобразование овальбумина и на макропористую морфологию получающихся криогелей сильно влияет количество мочевины в исходном растворе: при ее концентрации 1 моль/л образуются поры диаметром 30–110 мкм, а при концентрации мочевины 2,5 моль/л – диаметром 10–60 мкм.

Химически сшитые овальбуминовые криогели синтезируют криогеной обработкой растворов белка с добавлением кросс-агента. Например, в результате замораживания при  $-18$  °С смешанного раствора овальбумина с хитозаном, ферментом (глюкозооксидаза либо пероксидаза) и глутаровым альдегидом, выдерживания образцов в замороженном состоянии и последующего оттаивания получают губчатые «ферментативно-активные» криогели с порами диаметром 40–120 мкм. Для данных макропористых матриц характерна высокая скорость протока воды – порядка 660 мл/ч, что позволяет использовать их в качестве биокатализаторов проточного типа. Показано, что иммобилизованные в таких широкопористых матрицах ферменты сохраняют до 80% своей начальной активности [74].

Для биотехнологического и биомедицинского применения большой интерес представляют криогенно-структурированные материалы на основе альбумина сыворотки крови человека или животных. Содержание альбумина в сыворотке крови достигает 50% от массы суммарного белка [75]. Структура и свойства сывороточного альбумина незначительно отличаются в зависимости от видовой принадлежности используемой для его выделения крови, а ввиду распространенности сывороточный альбумин крупного рогатого скота можно рассматривать как удобный белковый предшественник для получения соответствующих криогелей и криоструктуратов.

К одним из первых упоминаний альбуминовых криогелей относится ряд работ [76–79], в которых альбуминовые губчатые матрицы были использованы в качестве носителей для иммобилизации органелл или клеток с получением соответствующих биокатализаторов. Методика формирования криогелей на основе бычьего сывороточного альбумина (БСА) в этих случаях была практически идентичной: органеллы растительных клеток или бактерии суспендировали в водном 4,6–7%-ном растворе альбумина, добавляли необходимое количество раствора глутарового альдегида и такую реакционную систему замораживали ( $-20 \dots -30^\circ\text{C}$ ) в течение 2–12 ч, а затем оттаивали. В результате получались белковые губки с порами 10–50 мкм, а соответствующие клеточные органеллы или бактерии оказывались включенными в стенки макропор криогеля, сохраняя в той или иной степени свою биологическую активность.

Систематическое исследование различных путей формирования альбуминовых криогелей и криоструктуратов, предпринятое авторами настоящего обзора, позволило разработать несколько подходов к получению таких материалов, а также выявить основные факторы, влияющие на физико-химические и структурные особенности образующихся белковых матриц [30, 80–83]. Основные варианты, схематически приведенные на рис. 4.4, таковы:

- а) Образование трехмерной полимерной сетки стенок макропор альбуминовых криогелей за счет индуцированного денатурантами (смесь мочевины и цистеина) разворачивания белковых глобул с одновременным ковалентным сшиванием полипептидных цепей дисульфидными мостиками через реакции тиол-дисульфидного обмена [80, 82].
- б) Формирование ковалентных узлов пространственной сетки криогеля с помощью сшивающего агента (водорастворимый карбодимид), внесенного в раствор альбумина до замораживания [81].
- в) Получение белкового криоструктурата лиофильным высушиванием раствора альбумина с последующей фиксацией текстуры губки ее обработкой раствором сшивающего агента в среде перастворителя полимера (раствор карбодимида в этаноле) [83].

Во всех этих случаях криогенно-структурированные альбуминовые матрицы имеют широкопористую губчатую морфологию. До замораживания исходной системы полимерный предшественник, т. е. альбумин, равномерно распределен в объеме раствора, по завершении процесса сшитый полимер сконцентрирован в тонких стенках макропор, где его содержание для набухших в воде препаратов почти на порядок величины превышает исходное значение концентрации белка. Размеры пор в таких губках определяются как концентрацией предшественников в начальных растворах

(I или II, рис. 4.4), так и условиями криогенной обработки (от II к III, рис. 4.4).



Рис. 4.4. Принципиальные схемы формирования криогелей и криоструктуратов на основе сывороточного альбумина [30]

Так, для «денатурационных» альбуминовых криогелей (рис. 4.4, а) показано, что помимо температуры замораживания, существенным фактором является количество мочевины в реакционной смеси (рис. 4.4, IIa): повышение концентрации этого денатуранта приводит к уменьшению сечения пор (рис. 4.5 и табл. 4.2) [30, 80]

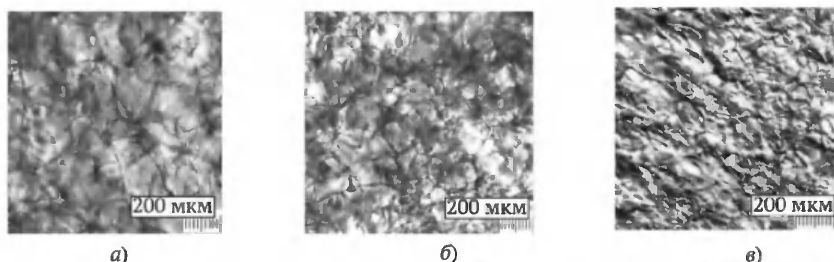


Рис. 4.5. Микрофотографии окрашенных метиленовым синим альбуминовых криогелей I-го типа, сформированных замораживанием при  $-15^{\circ}\text{C}$  растворов, содержащих белок (4 г/дл), цистеин (0,01 моль/л), а также 0,5 моль/л (а), 1,0 моль/л (б) и 1,5 моль/л (в) мочевины [30]

Такие альбуминовые губки не содержат в своем составе каких-либо примесей небелковой природы, полипептидные цепи в узлах пространственной сетки сшиты дисульфидными связями звеньев цистина, и поэтому при биодegradации материала, например при его использовании качестве носителя для доставки медикаментозных веществ в организм (так называемые лекарственные «депо-формы»), не образуются нежелательные соединения – протеолитические ферменты организма гидролизуют белковую губку практически до аминокислот [82].

Поскольку сывороточный альбумин содержит в боковых цепях большое количество  $\beta$ - и  $\gamma$ -карбоксильных групп звеньев, соответственно, аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также  $\epsilon$ -аминогрупп звеньев лизина, то это позволяет для получения криогелей, химически сшитых привнесенным

**Таблица 4.2.** Влияние концентрации мочевины в растворе и температуры его замораживания на сечение макропор альбуминовых криогелей «денатурационного» типа (рис. 4.4, а) [31]

Концентрация мочевины в растворе (II, рис. 4.4), моль/л	Температура замораживания, °С	$D_n^*$ , мкм	$D_w^*$ , Мкм	$k = D_n/D_w^*$
0,5	-15	105,4 ± 31,7	148,0 ± 59,3	1,40
1,0		102,0 ± 25,8	149,9 ± 61,1	1,47
1,5		98,9 ± 26,1	127,3 ± 42,9	1,29
2,0		92,2 ± 24,6	120,1 ± 40,9	1,30
0,5	-20	68,2 ± 14,9	86,0 ± 25,4	1,26
1,0		73,9 ± 17,3	95,5 ± 31,5	1,29
1,5		57,7 ± 16,6	75,8 ± 29,0	1,31
2,0		**	**	**

\* $D_n$  и  $D_w$  — значения средне-кубического численного и средне-кубического взвешенного диаметров пор, соответственно;  $k$  — коэффициент полидисперсности.

\*\*Образцы с низкой механической прочностью

кросс-агентом (рис. 4.4, б), использовать такие конденсирующие агенты, как водорастворимые карбодимиды, в частности, ЭДК (рис. 4.2). Это приводит к образованию межмолекулярных так называемых изопептидных связей, играющих роль химических узлов пространственной сетки, соответствующих гелевых матриц [81]. При этом выход реакции сшивания зависит от концентраций белка и ЭДК в исходном реакционном растворе (рис. 4.4, IIб). Диаметр же крупных пор получаемых белковых губок главным образом определяется температурой замороженной системы, где протекает криотропное гелеобразование: чем ниже эта температура, тем

мельче частицы порошена — поликристаллы льда и тем меньше размер пор соответствующего криогеля (рис. 4.6).

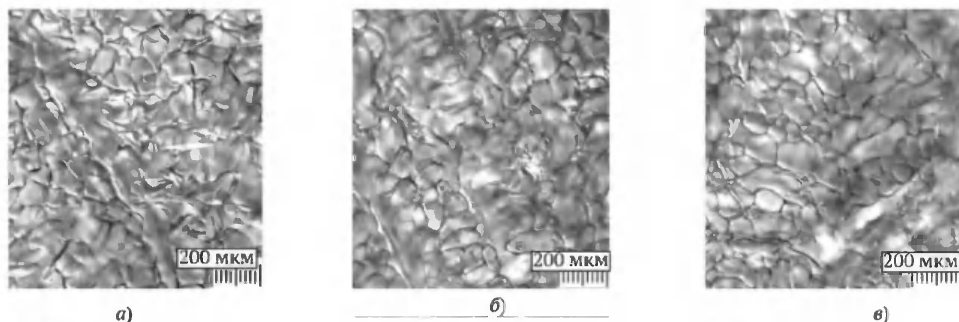


Рис. 4.6. Микрофотографии (оптический стереомикроскоп) химически-сшитых альбуминовых криогелей (рис. 4.4, б), сформированных при  $-15$  (а),  $-20$  (б) и  $-25$  °С (в) [30]

Практически та же тенденция в плане влияния температуры криогенной обработки на диаметр пор характерна и для альбуминовых криоструктуратов (рис. 4.4, в), где замораживание раствора белка и дальнейшая лиофилизация формируют пористую губку, для перевода которой в водонерастворимую форму (от IIIв к IVв, рис. 4.4) необходимо последующее дополнительное химическое сшивание макромолекул белка в объеме полимерной фазы стенок макропор [30, 83]. Понижение температуры замораживания исходного раствора альбумина перед лиофилизацией приводит к уменьшению диаметра пор в получаемом криоструктурате (рис. 4.7). Толщина стенок макропор набухшей в воде губки лежит в пределах 5–15 мкм.

Сравним размеры пор альбуминовых криогелей, сформированных сшиванием макромолекул белка с помощью ЭДК в замороженной среде (рис. 4.4, б), с порами криоструктуратов, приготовленных из эквипонцентрированного раствора альбумина замораживанием при той же отрицательной температуре с последующей лиофилизацией и сшивкой таким же карбодимидом (рис. 4.4, в). Оказывается, что значения показателей  $D_n$  и  $D_w$  у криоструктуратов оказываются в 1,5–2 раза выше. Это свидетельствует о том, что сублимация льда приводит к дополнительному сильному уплотнению полимерной фазы стенок макропор, а дальнейшая обработка материала сшивающим агентом, т. е. фактически дубление белковой губки, фиксирует такую уплотненную структуру этих стенок.

В настоящее время различные альбуминовые криогели и криоструктураты, а также аналогичные по текстуре белковые губки, полученные на основе плазмы или сыворотки крови, интенсивно исследуются в плане

возможностей их применения в биомедицинской практике, а некоторые материалы уже используют для этих целей. В частности это относится к биоразлагаемым носителям для депо-форм лекарственных средств, к кровоостанавливающим и антимикробным покрытиям (после насыщения губки соответствующим действующим началом) на раны и ожоги, к биосорбентам, к пористым подложкам для клеточных технологий и др. [30, 33, 82, 84–87].

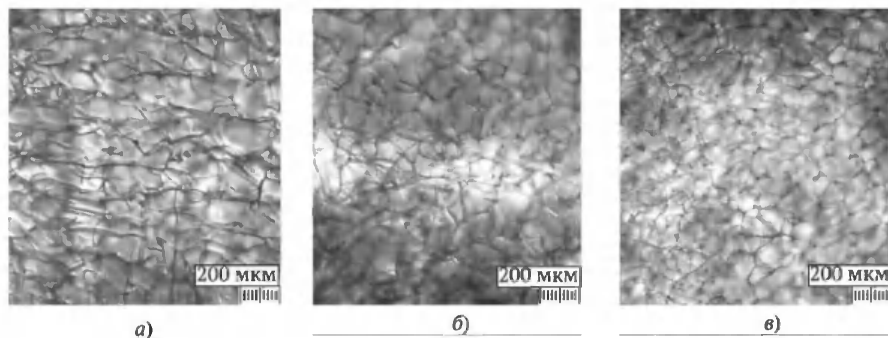


Рис. 4.7. Микрофотографии (оптический стереомикроскоп) и параметры диаметра макропор химически-сшитых альбуминовых криоструктуратов (рис. 4.4, в), сформированных при  $-15$  (а),  $-20$  (б) и  $-25$  °С (в) [30]

Помимо криогенно-структурированных материалов на основе различных альбуминов описаны криогели и криоструктураты, приготовленные и из других глобулярных белков. Примером являются криогели, содержащие фибриноген — олигомерный глобулярный белок плазмы крови, состоящий из трех соединенных дисульфидными мостиками полипептидных цепей. Он участвует в процессе свертывания крови, а также промотирует взаимодействия между отдельными клетками [88]. Криогенной обработкой ( $-12$  °С, 24 ч) растворов смеси фибриногена, желатины и глутарового альдегида (кросс-агент) получены белковые губки, средний диаметр макропор которых был в пределах 70–80 мкм. При повышении количества вводимого в систему сшивающего агента значительно снижалась степень набухания полимерной фазы (от 30 до 5 г  $H_2O$ /г белка) таких губчатых криогелей, а также почти на порядок падала скорость их 100%-ной биодegradации при инкубировании в 0,025%-ном растворе трипсина. Данные губчатые биоразлагаемые криогели предложено использовать в качестве подложек для культивирования фибробластов [89].

Интересным вариантом криогелей и криоструктуратов на основе глобулярных белков являются макропористые матрицы, формируемые из суспензий суммарного белка, изолированного из семян растений семейства

соевых — доступного биodeградируемого предшественника «зеленых» полимерных материалов. Обычно обезжиренный изолят соевого белка состоит на 80% из белков-глобулинов: 7S ( $\beta$ -конглицинин), 11S (глицинин) и  $\gamma$ -конглицинина [90]. При получении соответствующих широкопористых криоструктуратов 2-го типа (табл. 4.1) в водную дисперсию белкового изолята сои в качестве сшивающего агента вводили фермент — трансклутаминазу (ТГЗ), после чего систему инкубировали в течение 1 ч при 40 °С, замораживали при –15 °С и лиофилизировали [91]. Трансклутаминаза [92] катализирует реакции между боковыми карбоксамидными и первичными аминогруппами макромолекул белка с образованием межмолекулярных изопептидных связей (рис. 4.8) [30]. Диаметр пор полученных ферментативной сшивкой губчатых криоструктуратов лежал в диапазоне 20–120 мкм и зависел от содержания белка в исходной композиции. Показано, что данные материалы полностью биосовместимы и нетоксичны по отношению к мезенхимным стромальным клеткам человека.

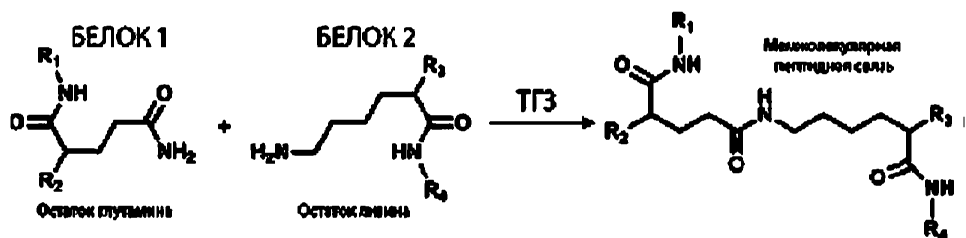


Рис. 4.8. Схема реакции сшивки между глутамильными и лизильными группами в составе макромолекул белка сои под действием трансклутаминазы (ТГЗ) с образованием межмолекулярной изопептидной связи [30]

Близкие по текстуре белковые криоструктураты получают при использовании химических сшивающих агентов, например глиоксаля [93]. Когда смесь предшественников инкубировали 1 ч при комнатной температуре, то формировался гель, который замораживали при –40 °С и лиофилизировали. Диаметр пор, синтезированных по этой схеме криоструктуратов, составлял 100–200 мкм. Для сравнительной оценки цитотоксичности полученных материалов по отношению к фибробластам аналогичным способом были приготовлены криоструктураты, сшитые с помощью ЭДК. При этом в случае культивирования клеток в сшитых глиоксалем широкопористых подложках выросло меньшее количество клеток в сравнении с подложками, сшитыми с помощью карбодимеда, что указывает на цитотоксическое действие продуктов биodeградации гелевой сетки, включавшей фрагменты диальдегида.

Основной белок молока казеин также был использован в качестве биополимерного предшественника для формирования белковых криогелей,

сшитых в замороженной среде ( $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 14 суток) ферментативно с использованием трансглутаминазы [37]. Казеин является олигомерным белком, не имеющим ярко выраженной третичной структуры, нерастворимым в воде и присутствующим в водных средах в виде мицелл [94]. Эффективность ферментативной сшивки составила порядка 80%, что было сопоставимо с величиной выхода гель-фракции желатиновых криогелей, полученных в параллельном опыте ковалентной сшивкой белка глутаровым альдегидом при той же минусовой температуре. В то же время, степень набухания казеиновых криогелей была в полтора раза ниже, что, по-видимому, может свидетельствовать о формировании под действием трансглутаминазы более плотно сшитой ковалентной гелевой сетки.

\* \* \*

В целом, можно заключить, что самые различные глобулярные белки являются удобными макромолекулярными предшественниками для формирования макропористых криогелей и криоструктуратов. Во многом это обусловлено многообразием присутствующих в таких белках химических группировок, что позволяет широко варьировать используемые сшивающие агенты, выбирая наиболее подходящие из них для получения криогенно-структурированных белковых матриц с требуемым набором свойств. Режимami же криогенных стадий процесса можно в известных пределах «управлять» макропористой морфологией таких полимерных материалов.

#### 4.3. Криогели и криоструктураты на основе белков с неупорядоченной конформацией статистического клубка

Типичным, известным и самым распространенным веществом белковой природы, макромолекулы которого в водной среде обладают неупорядоченной конформацией статистического клубка, является желатин. Желатин представляет собой смесь полипептидов, образующихся в результате термоденатурации и ограниченного щелочного («щелочной желатин») или кислотного («кислотный желатин») гидролиза коллаген-содержащего сырья, полученного из различных источников [95]. Первичная структура цепей желатина близка коллагену, но в отличие от него желатин растворим в воде при температурах выше  $38\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , что используется для приготовления на его основе исходных растворов предшественников при формировании различных желатин-содержащих материалов. В ходе щелочного гидролиза происходит омыление боковых амидных группировок звеньев



аспарагина и глутамина с их трансформацией, соответственно, в звенья аспарагиновой или глутаминовой кислот, и поэтому изоэлектрическая точка «щелочного» желатина смещена в кислую область. При кислотном гидролизе омыление амидов незначительное, поэтому у «кислотного» желатина изоэлектрическая точка мало отличается от коллагена, что указывает на предпочтительность использования желатина именно этого типа при получении матриц для клеточных технологий.

Желатин и гидрогели на его основе широко применяются в пищевой промышленности, прикладной биохимии, биотехнологии, медицине, в производстве фотоматериалов, лекарственных форм и др. [96–98]. В последние годы в связи с интенсивным развитием клеточных технологий и тканевой инженерии разрабатываются специальные полимерные материалы на основе желатина с целью их использования в качестве носителей или подложек для культивирования клеток животных и человека [99–101]. Интерес к таким материалам обусловлен хорошей биосовместимостью желатина, его нетоксичностью, невысокой стоимостью, а также тем, что высоко очищенный желатин относится к веществам, разрешенным большинством современных фармакопей к применению *in vivo* [102]. К достоинствам желатина как полимерного предшественника для получения на его основе криогелей и криоструктуратов относится высокая гибкость его цепей, придающая конечному материалу хорошую эластичность. Кроме того, поскольку макромолекулы желатина не имеют детерминированной конформации, присущей фибриллярным или глобулярным белкам, то криогенное воздействие фактически никоим образом не может вызвать у желатина денатурационные изменения. Поэтому такие свойства желатина, как его биосовместимость, неиммуногенность, нетоксичность и т. п., не изменяются после формирования криогенно-структурированного материала.

Например, сшитые глутаровым альдегидом желатиновые криогели предложено использовать в качестве матриц для трехмерного культивирования клеток с последующим применением препаратов «клетки-на-подложке» для регенерации мягких тканей [37]. Чтобы при синтезе криогелей раствор желатина в смеси кросс-агентом быстро не желировал еще до замораживания, часто используют желатин, полученный из коллагена кожи рыб, обитающих в холодной воде, т. к. растворы таких марок желатина претерпевают золь-гель переход медленнее и при температурах ниже, чем растворы желатина из коллагена животного происхождения. Также сшитые глутаровым альдегидом желатиновые губки, синтезированные из такого «рыбного» желатина в замороженной среде ( $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 ч), хорошо себя зарекомендовали как подложки для культивирования первичных кератиноцитов и фибробластов человека [103]. На поверхности полученных

губчатых образцов *in vitro* кератиноциты формировали сплошной слой эпителия, а фибробласты мигрировали вглубь макропор таких матриц, образуя там структуры подобные дерме кожи. Доклинические испытания на свиньях показали нетоксичность и биосовместимость таких желатиновых криогелей.

Введение в состав исходной реакционной системы добавок хитозана и хондроитинсульфата (гликозаминогликан, входящий в состав соединительных тканей, костей и хрящей и способствующий пролиферации и миграции хондроцитов [104]) заметно повышает механическую прочность подобных желатиновых криогелей [105], которые использованы для культивирования хондроцитов крупного рогатого скота. Также повышение прочности желатиновых криогелей в результате введения в исходную композицию некоторого количества агарозы, а также хитозана, который дополнительно способствует адгезии и пролиферации клеток [46], было использовано при получении имплантов для восстановления хрящевых тканей [106]. После имплантации в дефект хрящевой ткани коленного сустава кролика через 4 недели данные гистологии показали восстановление хряща и отсутствие в районе раны каких-либо воспалительных реакций.

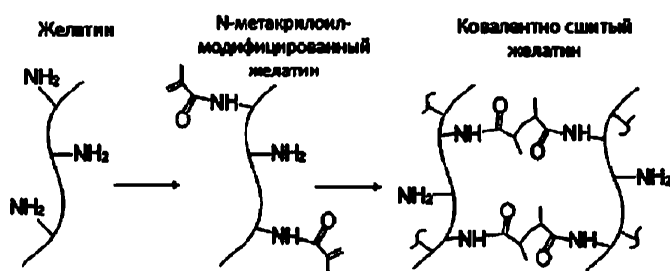


Рис. 4.9. Общая схема синтеза желатинового криогеля путем радикальной полимеризации N-метакрилоильного производного желатина [30]

Желатин является удобным объектом для химической модификации и функционализации с целью изготовления на его основе биосовместимых материалов со специфическими свойствами. Наряду с прививкой к желатину макромолекул других белков [107] либо полисахаридов [108], для получения ковалентно-сшитых желатиновых криогелей известны примеры химической модификации данного белка ненасыщенными соединениями акрилового ряда (ацилирование  $\epsilon$ -аминогрупп звеньев лизина) с дальнейшей радикальной криополимеризацией таких макромономеров, приводящей к образованию белковых губчатых матриц. Так, желатиновые губки получали при криополимеризации ( $-12\text{ }^\circ\text{C}$ ) N-метакрилоильного производного желатина (рис. 4.9), инициируемой окислительно-восстановительной парой персульфат — третичный амин [109], или в результате криополимеризации ( $-30\text{ }^\circ\text{C}$ ), инициируемой УФ-излучением [109].

В первом случае диаметр пор достигал примерно 250 мкм, во втором — не превышал 130 мкм, что связано с обычной тенденцией уменьшения размеров порогена — кристаллов льда — при понижении температуры замораживания системы. В опытах *in vitro* и *in vivo* продемонстрирована совместимость таких полимеризационных желатиновых криогелей с фибробластами человека и нетоксичность таких матриц при имплантации мышам [110].

Известны примеры и других желатиновых криогелей, при синтезе которых использовался белок, полученный из коллагена различных типов, применялись разные сшивающие агенты (как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные) [111–118], а в состав исходной композиции вводили растворимые или нерастворимые (дисперсные наполнители) [119–121] добавки.

В некоторых случаях для биомедицинского применения желатиновых криогелей необходимо, чтобы материал помимо желатина содержал бы и определенные добавки. Они должны целенаправленно корректировать биологические и/или физико-механические свойства носителей, требуемые в конкретных вариантах использования соответствующих желатиновых матриц. Так, например, получены губчатые криогели из композиции, включающей желатин, глутаровый альдегид и фибриноген, промотирующей рост клеток соединительной ткани в объеме макропористой подложки [89]. В работе [122] описан носитель, сформированный из раствора смеси желатина, глутарового альдегида и ламинина, способствующего адгезии определенных клеток к поверхности стенок макропор биополимерной губки.

Сразу после приготовления раствор таких смесей порциями по 0,25 мл замораживали при  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение ночи, затем оттаивали, промывали водой от золь-фракции и далее обрабатывали раствором  $\text{NaBH}_4$  для восстановления альдиминных группировок. При биотестировании желатин-фибриногеновых носителей показало, что введение фибриногена в состав криогеля улучшает адгезию фибробластов и способствует лучшей пролиферации клеток, чем при использовании желатинового криогеля без добавок фибриногена. При биотестировании желатин-ламининовых носителей было найдено, что добавки ламинина способствуют направленной дифференциации стволовых клеток. К сожалению, криогели такого типа получают воспроизводимо только в виде препаратов малого размера из-за быстрого гелеобразования реакционной смеси еще до ее замораживания. Чтобы происходило формирование именно криогеля, раствор должен «успеть» замерзнуть, пока не зажелировал.

Включение различных дисперсных частиц в полимерную матрицу желатиновых криогелей позволяет получать композитные материалы, у которых соответствующий наполнитель может выполнять не только физи-

ческую функцию повышения механической прочности материала в целом, но и действовать в качестве адсорбента или как «депо» для пролонгированного высвобождения каких-либо веществ. Примеры: включение частиц активированного угля в состав криогеля или измельченного монтмориллонита (источник ионов фосфата и кальция при медленном растворении такого наполнителя) [123].

Не только криогели на основе желатина, но и криоструктураты, причем обоих классифицированных в табл. 4.1 типов, также описаны в ряде публикаций. Например, замораживанием ( $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) дисперсии наночастиц серебра ( $0,01\text{--}0,04$  моль/л) в водном растворе кислотного желатина, дальнейшей лиофилизацией и задубливанием сформированного таким образом макропористой губки  $0,5\%$ -ным спиртовым раствором дженипина получен химически-сшитый желатиновый криоструктурат 1-го типа (табл. 4.1) с порами от 100 до 1000 мкм, что, как и скорость биодеградации материала, зависит от концентрации дисперсного наполнителя [124].

В целом получение желатиновых криоструктуратов 1-го типа (табл. 4.1), исходя из водных растворов этого полимерного предшественника, сопряжено с рядом трудностей. В частности, существенным ограничением является исходная концентрация желатина, т. к. при содержании желатина более  $3\text{--}5\%$  в ходе охлаждения при замораживании раствора желатиновый гель образуется еще до замерзания образца, и кристаллы льда в той иной степени разрушают уже сформированную первичную сетку. Вторым принципиальным моментом при работе в водных средах является сложности в обеспечении стерильности получаемого белкового материала, поскольку в подавляющем числе случаев сами препараты желатина, из которого формируют соответствующий криоструктурат, контаминированы микроорганизмами [125]. Поэтому на завершающих стадиях процесса получения материала необходима стерилизация, обычные виды которой (автоклавирование, высокотемпературная обработка, облучение) для желатина малоприменимы.

Показано, что проблемы с преждевременным гелеобразованием и стерильностью можно преодолеть, если для приготовления растворов желатина вместо воды использовать диметилсульфоксид (ДМСО) [126, 127]. В этом случае схема формирования криоструктуратов включает растворение белка в ДМСО, замораживание этого раствора, криоэкстракцию поликристаллов ДМСО холодным этанолом, далее фиксацию полученной макропористой губки обработкой этанольным раствором какого-либо сшивающего агента и, наконец, если необходимо, сушку желатинового материала. В противоположность системам, где для получения криоструктуратов используются водные растворы желатина, быстро, особенно при концентрациях полимера больше  $3\text{--}5\%$ , превращающиеся в гель уже при поло-

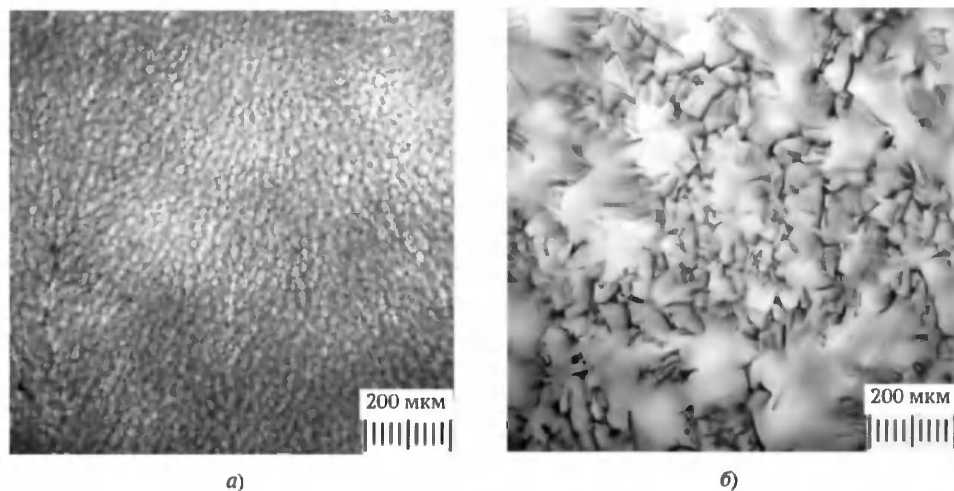
жительных температурах, применение ДМСО в качестве растворителя позволяет резко замедлить «саможелирование». При правильном выборе режима замораживания ДМСО-растворы этого белка не претерпевают золь-гель переход до кристаллизации такой желатин-содержащей полимерной композиции. Поскольку она в качестве жидкой фазы содержит только ДМСО, а при растворении в нем желатина осуществляется нагревание смеси до 60–80 °С, то одновременно с растворением полимера протекает и эффективная стерилизация системы, т. к. при такой обработке разрушается цитоплазматическая мембрана любых микроорганизмов [128]. Все последующие операции по получению конечного продукта проводятся в среде этанола, поэтому стерильность не нарушается.

Когда такие желатиновые криоструктураты формируют в виде пластин небольшой (2–5 мм) толщины, замораживая ДМСО-раствор полимера в литьевой форме, помещенной на охлаждаемую поверхность, то рост кристаллов растворителя происходит направленно по вектору теплопередачи «снизу – вверх». Как результат, макропоры у получающейся в результате желатиновой губки имеют градиентную морфологию [31, 126]: достаточно регулярные поры меньшего сечения в нижней части пластины и нерегулярные гораздо более крупные поры в верхней части образца (рис. 4.10). Такой характер пористости фактически отражает специфику «разветвленной» кристаллизации ДМСО ( $T_{\text{крист}} = +18,4$  °С) при направленном охлаждении растворов желатина в этом растворителе.

Желатиновые криоструктураты 2-го типа (табл. 4.1), т. е. широкопористые матрицы, образующиеся в результате лиофилизации соответствующих гелей, сформированных в жидкой среде при положительной температуре, тоже получены. Так, из гидрогеля, приготовленного на основе смешанного раствора желатина, агарозы и дженипина замораживанием при –85 °С и последующей сублимационной сушкой, были приготовлены криоструктураты, которые предложено использовать в качестве биodeградируемых мембранных фильтров для отделения примесей нефти от воды [129]. Другие варианты губчатых желатиновых матриц, полученных по схеме «гелеобразование при положительной температуре — замораживание — лиофилизация», разрабатывались для их применения в клеточных технологиях в качестве макропористых подложек для трехмерного культивирования фибробластов, эндотелиальных, глиальных и др. клеток человека [130].

Ключевые отличия свойств полимерной фазы криоструктуратов 1-го и 2-го типов (табл. 4.1), т. е. разница характеристик и тонкой структуры стенок макропор, обусловлены предысторией образования этой фазы. Естественно, это относится также и к желатин-содержащим матрицам. В первом случае замораживается раствор, и после кристаллизации раство-

рителя полимер сконцентрирован в незамерзшей жидкой микрофазе, где его содержание в основном зависит от температуры замороженной системы, определяющей соотношение твердой и жидкой фаз, а отсюда и объем последней. Дальнейшее удаление кристаллов растворителя лиофилизацией или криоэкстракцией еще более концентрирует полимер в стенках макропор.



**Рис. 4.10.** Микрофотографии (оптический микроскоп) нижней а) и верхней б) поверхностей желатинового криоструктурата (пластина 2-мм толщины), сформированного из 7%-ного ДМСО-раствора кислотного желатина замораживанием при  $-20^{\circ}\text{C}$  с последующей криоэкстракцией кристаллов порообразователя этанолом при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 3 суток (препараты окрашены амидо-черным) [126]

При получении криоструктуратов 2-го типа замораживается уже сформированный первичный гель — набухшая трехмерная полимерная сетка, поэтому рост кристаллов растворителя в определенной мере затруднен вплоть до возможности механического разрыва «слабых» элементов сетки [131, 132]. Поэтому даже если в растворе и в геле концентрация полимера одинаковая, то степень его криоконцентрирования в незамерзшей жидкой микрофазе при одной и той же отрицательной температуре в этих двух системах будет разная, меньшая в замороженном геле. Как следствие, после его лиофилизации морфология и свойства полимерной фазы криоструктурата 2-го типа отличаются от соответствующих параметров криоструктурата 1-го типа, приготовленного из эквиконцентрированного раствора того же полимера при той же температуре криогенной обработки.

Все увеличивающееся число публикаций, связанных с получением, исследованием свойств и применением (главным образом, для биомедицинских целей) желатиновых криогелей и криоструктуратов, демонстрирует большой интерес к данным полимерным материалам. Доступность желатина, его невысокая стоимость, биосовместимость и нетоксичность во многом определяют такой интерес, а широкий выбор возможностей для варьирования физико-химических характеристик и макропористой морфологии подобных белковых матриц, который методы криоструктурирования «предоставляют» разработчикам конкретных материалов, определяют перспективность последних.

## Заключение

Одним из активно развивающихся направлений современной науки о высокомолекулярных соединениях является разработка принципиально новых материалов, применение которых способствует прогрессу передовых областей техники, здравоохранения и естествознания. В существенной степени это касается биомедицинских отраслей и биотехнологии, где к подобным материалам предъявляется специфический набор требований. Главными из них являются биосовместимость и нетоксичность полимерной основы, стабильность материала или, напротив, его контролируемая биодеградируемость, достаточная механическая прочность полимерной системы, причем очень часто в сочетании с развитой макропористой структурой и др. Последнее качество принципиально важно, когда речь идет о покрытиях на раны и ожоги, систем контролируемой доставки лекарственных веществ, о работе с биологическими нано- и микрочастицами (сложные биополимерные комплексы, вирусы, фаги, клеточные органеллы, целые клетки), где необходим такой уровень пористости полимерной матрицы, который позволяет «большим» биологическим частицам проникать в массу материала и взаимодействовать с его компонентами по всему объему. Проблема особой пористости полимерного носителя актуальна и в биокаталитических системах, например в случае иммобилизованных ферментов или целых клеток.

В последнее время резко возрос интерес к сверхмакропористым гелевым материалам, используемым в качестве объемных подложек для культивирования животных клеток или разработки имплантатов, содержащих соответствующие клетки (например, стволовые клетки), которые помещены на такую полимерную основу. Большинству из вышеуказанных требований отвечают различные *криогели* и *криоструктураты* — высокопористые полимерные материалы, формирование которых осуществляется

в неглубоко замороженной среде. Их характерной морфологической особенностью является макропористость, причем макропоры взаимосвязаны. В зависимости от свойств и концентрации предшественников, а также от режимов криогенной обработки, можно получить «изделия» как разной химической природы, так и структуры (пористости). В этом контексте, отдельный научный и прикладной интерес представляют криогели и криоструктураты на основе белковых веществ, поскольку в большинстве случаев белковые материалы биосовместимы, нетоксичны и биodeградируемы.

Изложенная выше информация о белковых криогелях и криоструктуратах свидетельствует, что такого рода материалы с помощью приемов криоструктурирования могут быть сформированы при использовании в качестве предшественников белков разных типов — фибриллярных, глобулярных, белков с неупорядоченной клубковой конформацией полипептидных цепей. При этом на комплекс физико-химических свойств получаемых криогенно-структурированных матриц и их макропористую морфологию влияет множество факторов, к основным из которых относятся тип белка, его концентрация в исходном растворе, концентрация сшивающих агентов (если таковые применяются), присутствие и количество растворимых или дисперсных добавок, а также, конечно, режимы криогенного воздействия. Несомненно, что такая многофакторность требует от разработчиков конкретного материала проведения систематических исследований для выявления оптимальных состава раствора предшественников и условий криогенного процесса. Однако эти усилия, как правило, «вознаграждаются» достигаемым результатом в виде инновационных практически значимых материалов, обладающих необходимым, зачастую уникальным, набором свойств.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-13-10365) и программы Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».

## **Авторы**

**Родионов Илья Александрович**, к.х.н., н.с. ИНЭОС РАН. Область научных интересов: белковые криогели и криоструктураты биомедицинского назначения.



**Синицкая Екатерина Сергеевна**, инж.-иссл. ИНЭОС РАН. Область научных интересов: синтез и свойства криогелей и криоструктуратов на основе биополимерных предшественников.

**Иванов Роман Викторович**, к.х.п., н.с. ИНЭОС РАН. Область научных интересов: биополимерные криогели и криоструктураты биомедицинского назначения.

**Цискарашвили Арчил Важаевич**, к.м.н, зав. отд. ЦИТО МЗ РФ. Область научных интересов: травматология и ортопедия, лечение инфицированных ран.

**Лозинский Владимир Иосифович**, д.х.н., проф., зав.лаб. ИНЭОС РАН; loz@ineos.ac.ru

Область научных интересов: криоструктурирование полимерных систем, криогели и криоструктураты на основе синтетических и природных полимеров, практическое применение криогенно-структурированных полимерных материалов.

## Литература

1. *Мовшович И.А., Виленский В.Я.* Полимеры в трансплантологии и ортопедии. М.: Медицина. 1978. 320 с.
2. *Штильман М.И.* Полимеры медико-биологического назначения. М.: ИКЦ Академкнига, 2000. 247 с.
3. *Temenoff J.S., Mikos A.G.* Biomaterials: the intersection of biology and materials science. New Jersey: Pearson, 2008. 504 p.
4. Biomedical materials. Ed. Narayan R. Boston: Springer-Verlag US. 2009. 546 p.
5. Биосовместимые материалы. Под ред. Севастьянова В.И., Кирпичникова М.П. М.: Из-во «МИА», 2011. 544 с.
6. *Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д.* Иммуобилизованные клетки микроорганизмов. 2-е изд., Из-во МГУ, Москва, 1994. 288 с.
7. *Еликов Н.П.* Основы биотехнологии. СПб.: Наука. 1995. 605 с.
8. *Прицеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С.* Основы фармацевтической биотехнологии. Ростов-на-Дону: Феникс. 2006. 256 с.
9. *Godbey W.T.* An introduction to biotechnology. Amsterdam: Academic Press. 2014. 436 p.
10. <http://dic.academic.ru/dic.nsf/meditem/486>
11. *Jagur-Grodzinski J.* Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies. – Polym. Adv. Technol., 2006, **17**, 395.
12. *Shoichet M.S.* Polymer scaffolds for biomaterials applications. Macromolecules. – 2010, **43**, 581.
13. *Van Vlierberghe S, Dubruel P, Schacht E.* Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. – Biomacromolecules. 2011, **12**, 1387.
14. *Hutmacher D.W.* Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues – state of the art and future perspectives. – J. Biomater. Sci. Polym. Edn., 2012, **12**, 107.
15. *Okay O.* Macroporous copolymer networks. – Progr. Polym. Sci., 2000, **25**, 711.

16. *Okay O.* Production of macroporous polymeric materials by phase separation polymerization. pp. 3–22 in: *Macroporous Polymers: Production, Properties and Biotechnological/Biomedical Applications.* /edited by B.Mattiasson, A.Kumar, I.Galaev. — Boca Raton e.a.: CRC Press, Boca Raton e.a., 2010. — 532 p.
17. *Soykeabkaew N., Thanomsilp C., Suwanton O.* Starch-based composite foams. — *Composites, Part A*, 2015, **78**, 246.
18. *Liao C.J., Chen C.F., Chen J.H., Chiang S.F., Lin Y.J., Chang K.Y.* Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. — *J.] Biomed. Mater. Res.*, 2002, **59**, 676.
19. *Hacker M.C., Ambrosch K., Schulz-Siegmund M.* Macroporous polymer scaffolds through leaching processes. pp. 49–82 in: *Macroporous Polymers: Production, Properties and Biotechnological/Biomedical Applications* /edited by B. Mattiasson, A. Kumar, I. Galaev. — Boca Raton: CRC Press, 2010. — 532 p.
20. *Лозинский В.И.* Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения. — *Успехи химии*. 2002, **71**, 559.
21. *Lozinsky V.I., Okay O.* Basic principles of cryotropic gelation. — *Adv. Polym. Sci.*, 2014, **263**, 49.
22. *Qian L., Zhang H.* Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials. — *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2011, **86**, 172.
23. *Geidobler R., Winter G.* Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying: Fundamentals and technology review. — *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2013, **85**, 214.
24. *Лозинский В.И.* Криоструктурирование полимерных систем как инструмент создания инновационных материалов биомедицинского назначения. — в кн. *Криохимические методы создания гибридных наночастиц лекарственных веществ и биоактивных металлов*. Под. ред. Мельникова М.Я., М.: изд-во «Техносфера», 2018, глава 3.
25. *Сергеев Г.Б., Батюк В.А.* Реакции в многокомпонентных замороженных системах. *Успехи химии*. — 1976, **45**, 793.
26. *Lozinsky V.I., Vainerman E.S., Korotaeva G.F., Rogozhin S.V.* Study of cryostructurization of polymer systems. III. Cryostructurization in organic media. — *Colloid & Polymer Sci.*, 1984, **262**, 617.
27. *Polymeric Cryogels: Macroporous Gels with Remarkable Properties.* Ed. Okay O., Cham e.a.: Springer. 2014. 330 .
28. *Supermacroporous Cryogels: Biomedical and Biotechnological Applications.* Ed.] Kumar A., Boca Raton: CRC Press. 2016. 480 .
29. *Rodionov I.A., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Ya., Shabatina T.I., Lozinsky V.I.* Cryostructuring of polymer systems. 44. Freeze-dried and then chemically cross-linked wide porous cryostructures based on serum albumin. — *e-Polymers*. 2017, **17**, 263.
30. *Родионов И.А.* Криогели на основе сывороточного альбумина: синтез, свойства, структура и возможности биомедицинского применения. — *Дис. канд. хим. наук, М.; ИНЭОС РАН*, 2017, 156 с.
31. *Lozinsky V.I., Kulakova V.K., Ivanov R.V., Petrenko A.Yu., Rogulska O.Yu., Petrenko Yu.]A.* Cryostructuring of polymer systems. 47. Preparation of wide porous gelatin-based cryostructures in sterilizing organic media and assessment of the suitability of thus formed matrices as spongy scaffolds for 3D cell culturing. — *e-Polymers*, 2018, **18**. 175.
32. *Lozinsky V.I.* Cryostructuring of polymer systems. 50. Cryogels and cryotropic gel formation: terms and definitions. — *Gels*, 2018, **4**. 77.
33. *Gallego L., Junquera L., Garcia E., Garcia V., Alvarez-Viejo M., Costilla S., Fresno M.F., Meana A.* Repair of rat mandibular bone defects by alveolar osteoblasts in a novel plasma-derived albumin scaffold. — *Tissue Eng.* 2010, **16**, 1179.

34. *Lozinsky V.I., Plieva F.M., Galaev I.Yu., Mattiasson B.* The potential of polymeric cryogels in bioseparation. — *Bioseparation*. 2001, **10**, 163.
35. *Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Plieva F.M., Savina I.N., Jungvid H., Mattiasson B.* Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. — *Trends in Biotechnol.* 2003, **21**, 445.
36. *Лозинский В.И.* Новое семейство макропористых и сверхмакропористых материалов биотехнологического назначения — полимерные криогели. — *Известия РАН, Сер. хим.*, 2008, № 5, 996.
37. *Elowsson L., Kirsebom H., Carmignac V., Durbeej M., Mattiasson B.* Porous protein-based scaffolds prepared through freezing as potential scaffolds for tissue engineering. — *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2012 **23** 2489.
38. *Yazdimaghani M., Vashae D., Assefa S., Walker K.J., Madihally S.V., Kuhler G.A., Tayebi L.* Hybrid macroporous gelatin/bioactive-glass/nanosilver scaffolds with controlled degradation behavior and antimicrobial activity for bone tissue engineering. — *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2014, **10**, 911.
39. *Vasconcelos A., Gomes A.C., Cavaco-Paulo A.* Novel silk fibroin/elastin wound dressings. — *Acta Biomater.*, 2012, **8**, 3049.
40. *Звожкова Е.Н.* Аминокислоты, пептиды и белки. с. 15–186 в кн. *Химия биологически активных природных соединений.* / под. ред. Преображенского Н.А. и Евстигнеевой Р.П. — М.: Химия. 1970, 512 с.
41. *Финкельштейн А.В., Птицын О.Б.* Физика белка. М.: Из-во КДУ в МГУ им.М.В. Ломоносова. 2012, 524 с.
42. *Fatih A., Oztoprak Z., Karakutuk I., Okay O* Macroporous silk fibroin cryogels–Biomacromol., 2013, **14**, 719.
43. *Sherman V.R., Yang W., Meyers M.A.* The materials science of collagen. — *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2015, **52**, 22.
44. *Mu C.* Collagen cryogel cross-linked by dialdehyde starch. — *Macromol. Mater. Eng.* 2010, **295**, 100.
45. *Tan H., Wu B, Li C., Mu C., Li H., Lin W.* Collagen cryogel crosslinked by naturally derived dialdehydecaboxymethyl cellulose. — *Carbohydr. Polym.*, 2015, **129**, 17.
46. *Chen F.M., Liu X.* Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. — *Progr. Polym. Sci.*, 2016, **53**, 86.
47. *Rodrigues S.C.* Preparation and characterization of collagen-nanohydroxyapatite biocomposite scaffolds by cryogelation method for bone tissue engineering applications. — *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2013 **101** 1080
48. *Nakajima N., Ikada Y.* Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. — *Bioconjugate Chem.*, 1995, **6**, 123.
49. *Chandika P., Ko S.-C., Oh G.-W., Heo S.-Y., Nguyen V.-T., Jeon Y.-J., Lee B., Jang C.H., Kim G.H., Park W.S., Chang W., Choi I.-W., Jung W.-K.* Fish collagen/alginate/chitoooligosaccharides integrated scaffold for skin tissue regeneration application. — *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, **81**, 504.
50. *Zhang J., Zhou A., Deng A., Yang Y., Gao L., Zhong Z., Yang S.* Pore architecture and cell viability on freeze dried 3D recombinant human collagen-peptide (RHC)–chitosan scaffolds. — *Mater. Sci. Eng.*, 2015, **49**, 174.
51. *Han B., Jaurequi J., Tang B., Nimni M.E.* Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. — *J. Biomed. Mater. Res., Part A*. 2003, **65**, 118.
52. *Pawelec K.M., Husmann A., Best S.M., Cameron E.* Altering crystal growth and annealing in ice-templated scaffolds. — *J. Mater. Sci.*, 2015, **50**, 7537.

53. Wu X., Liu Y., Li X., Wen P., Zhang Y., Long Y., Wang X., Guo Y., Xing F., Gao J. Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. — *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 1167.
54. Nazarov R., Jin H.-J., Kaplan D.L. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. — *Biomacromol.*, 2004, **5**, 718.
55. Belanger K., Dinis T.M., Taourirt S., Vidal G., Kaplan D.L., Egles C. Recent strategies in tissue engineering for guided peripheral nerve regeneration. — *Macromol. Biosci.*, 2016, **16**, 472.
56. Jin H.J., Kaplan D.L. Mechanism of silk processing in insects and spiders. — *Nature*. 2003, **424**, 1057.
57. Shimura K., Kikuchi A., Ohtomo K., Katagata Y., Hyodo A. Studies on silk fibroin of *Bombyx mori*. Fractionation of fibroin prepared from the posterior silk gland. — *J. Biochem.*, 1976, **80**, 693.
58. Zhu H., Yao D., Dong S., Lu Q., Kaplan D.L., Zhang B. Salt-leached silk scaffolds with tunable mechanical properties. — *Biomacromol.*, 2012, **13**, 3723.
59. Correia C., Bhumiratana S., Yan L., Oliveira A.L., Gimble J.M., Rockwood D., Kaplan D.L., Sousa R.A., Reis R.L., Vunjak-Novakovic G. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. — *Acta Biomater.*, 2012, **8**, 2483.
60. Zhang Y., Fan W., Ma Z., Wu C., Fang W., Liu G., Xiao Y. The effects of pore architecture in silk fibroin scaffolds on the growth and differentiation of mesenchymal stem cells expressing BMP7. — *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 3021.
61. Kadakia P.U., Jain E., Hixon K.R., Eberlin C.T., Sell S.A. Sonication induced silk fibroin cryogels for tissue engineering applications. — *Mater. Res. Express*. 2016, **3**, #055401.
62. Lu Q. Preparation of 3-D regenerated fibroin scaffolds with freeze drying method and freeze drying/foaming technique. — *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, 2006, **17**, 1349.
63. Lu G., Liu S., Lin S., Kaplan D.L., Lu Q. Silk porous scaffolds with nanofibrous microstructures and tunable properties. — *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2014, **120**, 28.
64. Wang Y., Bella E., Lee C.S.D., Migliaresi C., Pelcastre L., Schwartz Z., Boyan B.D., Motta A. The synergistic effects of 3-D porous silk fibroin matrix scaffold properties and hydrodynamic environment in cartilage tissue regeneration. — *Biomaterials*. 2010, **31**, 4672.
65. Fujikawa S., Nakamura S., Koga K. Genipin, a new type of protein crosslinking reagent from gardenia fruits. — *Agric. Biol. Chem.*, 1988, **52**, 69.
66. Jurga M., Dainiak M.B., Sarnowska A., Jablonska A., Tripathi A., Plieva F.M., Savina I.N., Strojek L., Jungvid H., Kumar A., Lukomska B., Domanska-Janik K., Forraz N., McGuckin C.P. The performance of laminin-containing cryogel scaffolds in neural tissue regeneration. — *Biomaterials*. 2011, **32**, 3423.
67. Balaji S., Kumar R., Sripriya R., Kakkar P., Ramesh D.V., Reddy P.N.K., Sehgal P.K. Preparation and comparative characterization of keratin-chitosan and keratin-gelatin composite scaffolds for tissue engineering applications. — *Mater. Sci. Eng. C: Mater. Biol. Appl.*, 2012, **32**, 975.
68. Лозинский В.И., Гнездилова Т.В. Способ получения губчатого коллаген-содержащего материала. — Пат. РФ № 2053796 (1992); Б.И. № 4 (1996).
69. Podorozhko E.A., Kurskaya E.A., Kulakova V.K., Lozinsky V.I. Cryotropic structuring of aqueous dispersions of fibrous collagen: The influence of the initial pH values. — *Food Hydrocolloids*. 2000, **14**, 111.
70. <http://kollagen.ru/gubki-kollagenovye-gemostaticheskie?yclid=688514396870940982>
71. <http://dic.academic.ru/dic.nsf/meditem/486>

72. Лозинский В.И., Константинова Н.Р., Соловьева Н.И. Способ получения пористого белкового геля. — Пат. РФ № 2058083 (1994); Б.И. № 11 (1996).
73. Konstantinova N.R., Lozinsky V.I. Cryotropic gelation of ovalbumin solutions. — *Food Hydrocoll.*, 1997, 11, 113.
74. Hedström M., Plieva F., Galaev I., Mattiasson B. Monolithic macroporous albumin/chitosan cryogel structure: a new matrix for enzyme immobilization. — *Anal. Bioanalyt. Chem.*, 2008, 390, 907.
75. Peters T. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Application. London: Academic Press. 1995. 432 p.
76. Thomasset B., Thomasset T., Vejux A., Jeanfils J., Barbotin J.N., Thomas D. Immobilized thylakoids in a cross-linked albumin matrix: effects of cations studied by electron microscopy, fluorescence emission, photoacoustic spectroscopy, and kinetic measurements. — *Plant Physiol.*, 1982, 70, 714.
77. Estival F., Burstein C. Immobilized thermophilic bacteria as a source of respiratory chain for the recycling of NAD<sup>+</sup>. — *Enzyme Microb. Technol.*, 1985, 7, 29.
78. Papageorgiou G.C., Lagoyanni T. Immobilization of photosynthetically active cyanobacteria in glutaraldehyde cross-linked albumin matrix. — *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1986, 23, 417.
79. Carpentier R., Lemieux S. Immobilization of the photosystem II submembrane fraction in a glutaraldehyde cross-linked matrix. — *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1987, 15, 107.
80. Rodionov I.A., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Ya., Lozinsky V.I. Cryostructuring of polymeric systems. 40. Proteinaceous wide-pore cryogels generated by the action of denaturant/reductant mixtures on bovine serum albumin in moderately-frozen aqueous media. — *Soft Matter*. 2015, 11, 4921.
81. Родионов И.А., Гринберг Н.В., Бурова Т.В., Гринберг В.Я., Лозинский В.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 42. Физико-химические свойства и микроструктура широкопористых ковалентно-сшитых альбуминовых криогелей. — *Коллоидн. журн.*, 2015, 58, 465.
82. Лозинский В.И., Родионов И.А., Цискаришвили А.В., Еськин Н.А. Антибактериальная белковая губка для химиотерапии инфицированных ран и способ ее получения. — Пат. РФ № 2637634 (2016); Б.И. № 34 (2017).
83. Rodionov I.A., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Ya., Shabatina T.I., Lozinsky V.I. Cryostructuring of polymer systems. 44. Freeze-dried and then chemically cross-linked wide porous cryostructures based on serum albumin. — *c-Polymers*. 2017, 17, 263.
84. Chow D., Nunalee M.L., Lim D.W., Simnick A.J., Chilkoti A. Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology. — *Mater. Sci. Eng. R. Rep.*, 2008, 62, 125.
85. Gallego L., Junquera L., Alvarez-Viejo M., Fresno M.F. Ectopic bone formation from mandibular osteoblasts cultured in a novel human serum-derived albumin scaffold. — *J. Biomater. Appl.*, 2010, 25, 367.
86. Li P., Lee I., Yu W., Sun J., Jane W., Shen H. A novel albumin-based tissue scaffold for autogenic tissue engineering applications. — *Sci. Rep.*, 2014, 4, # 5600.
87. Malekpour A., Khodadadi M. Albumin-functionalized magnetic nanoparticles as an efficient sorbent for removal of Pb(II), Cd(II), Cu(II) and Cr(VI) ions from aqueous solutions. — *RSC Adv.*, 2016, 6, 14705.
88. Laurens N., Koolwijk P., De Maat M.P.M. Fibrin structure and wound healing. — *J. Thromb. Haemost.*, 2006, 4, 932.
89. Dainiak M.B., Allan I.U., Savina I.N., Cornelio L., James E.S., James S.L., Mikhailovsky S.V., Jungvid H., Galaev I.Y. Gelatin-fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: Preparation, optimization and in vitro study. — *Biomaterials*. 2010, 31, 67.

90. *Nishinari K., Fang Y., Guo S., Phillips G.O.* Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. — *Food Hydrocoll.*, 2014, **39**, 301.
91. *Chien K.B., Shah R.N.* Novel soy protein scaffolds for tissue regeneration: Material characterization and interaction with human mesenchymal stem cells. — *Acta Biomater.*, 2012, **8**, 694.
92. *Nonaka M., Sakamoto H., Toiguchi S., Kawajari H., Soeda T., Motoki M.* Sodium caseinate and skim milk gels formed by incubation with microbial transglutaminase. — *J. Food Sci.*, 1992, **57**, 1214.
93. *Olami H., Zilberman M.* Microstructure and in vitro cellular response to novel soy protein-based porous structures for tissue regeneration applications. — *J. Biomater. Appl.*, 2016, **30**, 1004.
94. *Walstra P.* The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. — *J. Dairy Res.*, 1979, **46**, 317.
95. *Бейс А.* Макромолекулярная химия желатина. М.: Пищевая пром-сть, пер. с англ., 171, 479 с.
96. *Jones R.T.* Gelatin: manufacture and physico-chemical properties. In: *Pharmaceutical Capsules*. Eds. F.Podczeck, B.E.Jones. London: Pharmaceutical Press, 2004, pp.23-60.
97. *Djiagny V.B., Wang Z., Xu S.* Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries. — *Crit. Revs. Food Sci. Nutr.*, 2001, **41**, 481.
98. *Кузнецов В.Г., Бобикова Т.М., Заболотная О.Е., Фахрутдинов Э.А., Корень Н.Ш.* Способ получения желатина для фотоэмульсий. — А.С. СССР № 925972 (1980), Б.И. № 17 (1982).
99. *Jagur-Grodzinski J.* Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. — *Polym. Adv. Technol.*, 2006, **17**, 395.
100. *Shoichet M.S.* Polymer scaffolds for biomaterials applications. — *Macromolecules*. 2010, **43**, 581.
101. *Van Vlierberghe S., Dubruel P., Schacht E.* Biopolymer-based hydrogels for tissue engineering applications. — *Biomacromolecules*. 2011, **12**, 1387.
102. *Rose J.B., Pacelli S., El-Haj A.J., Dua H.S., Hopkinson A., White L.J., Rose F.R.A.J.* Gelatin-based materials in ocular tissue engineering. — *Materials*, 2014, **7**, 3106.
103. *Shevchenko R.V., Eeman M., Rowshanravan B., Allan I.U., Savina I.N., Illsley M., Salmon M., James S.L., Mikhailovsky S.V., James S.E.* The in vitro characterization of a gelatin scaffold prepared by cryogelation and assessed in vivo as a dermal replacement in wound repair. — *Acta Biomater.*, 2014, **10**, 3156.
104. *Uebelhart D.* Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis. — *Osteoarthr. Cartil.*, 2008, **16**, 19.
105. *Dwivedi P., Bhat S., Nayak V., Kumar A.* Study of different delivery modes of chondroitin sulfate using microspheres and cryogel scaffold for application in cartilage tissue engineering. — *Int. J. Polym. Mater.*, 2014, **63**, 859.
106. *Gupta A., Bhat S., Jagdale P.R., Chaudhari B.P., Lidgren L., Gupta K.C., Kumar A.* Evaluation of three-dimensional chitosan-agarose-gelatin cryogel scaffold for the repair of subchondral cartilage defects: an in vivo study in a rabbit model. — *Tissue Eng.*, 2014, **20**, 3101.
107. *Ito Y., Hasuda H., Terai H., Kitajima T.J.* Culture of human umbilical vein endothelial cells on immobilized vascular endothelial growth factor. — *J. Biomed. Mater. Res., Part A*. 2005, **74**, 659.
108. *Yang S.H., Chen P.Q., Chen Y.F., Lin F.H.* An in-vitro study on regeneration of human nucleus pulposus by using gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan tri-copolymer scaffold. — *Artif. Organs*. 2005, **29**, 806.

109. *Koshy S.T., Ferrante T.C., Lewin S.A., Mooney D.J.* Injectable, porous, and cell-responsive gelatin cryogels. — *Biomaterials*. 2014, **35**, 2477.
110. *Fassina L., Saino E., Visai L., Schelfhout J., Dierick M., Van Hoorebeke L., Dubruel P., Benazzo F., Magenes G., Van Vlierberghe S.* Electromagnetic stimulation to optimize the bone regeneration capacity of gelatin-based cryogels. — *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2012, **25**, 165.
111. *Wu X., Liu Y., Li X., Wen P., Zhang Y., Long Y., Wang X., Guo Y., Xing F., Gao J.* Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. — *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 1167.
112. *Berillo D., Elowsson L., Kirsebom H.* Oxidized dextran as crosslinker for chitosan cryogel scaffolds and formation of polyelectrolyte complexes between chitosan and gelatin. — *Macromol. Biosci.*, 2012, **12**, 1090.
113. *Chang K.-H., Liao H.-T., Chen J.-P.* Preparation and characterization of gelatin/hyaluronic acid cryogels for adipose tissue engineering: In vitro and in vivo studies. — *Acta Biomater.*, 2013, **9**, 9012.
114. *Berillo D., Volkova N.* Preparation and physicochemical characteristics of cryogel based on gelatin and oxidised dextran. — *J. Mater. Sci.* 2014 49 4855.
115. *Singh D., Tripathi A., Zoa S.M., Singh D., Han S.S.* Synthesis of composite gelatin-hyaluronic acid-alginate porous scaffold and evaluation for in vitro stem cell growth and in vivo tissue integration. — *Coll. Surf., B Biointerfaces*, 2014, **116**, 502.
116. *Sharma A., Bhat S., Nayak V., Kumar A.* Efficacy of supermacroporous poly(ethylene glycol)-gelatin cryogel matrix for soft tissue engineering applications. — *Mater. Sci. Eng. C.*, 2015, **47**, 298.
117. *Kuo C.-Y., Chen C.-H., Hsiao C.-Y., Chen J.-P.* Incorporation of chitosan in biomimetic gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan cryogel for cartilage tissue engineering. — *Carbohydr. Polym.*, 2015, **6**, 722.
118. *Van Vlierberghe S.* Crosslinking strategies for porous gelatin scaffolds. *J. Mater. Sci.*, 2016, **51**, 4349.
119. *Ozturk B.Y., Inci I., Egri S., Ozturk A.M., Yetkin H., Goktas G., Elmas C., Piskin E., Erdogan D.* The treatment of segmental bone defects in rabbit tibiae with vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded gelatin/ hydroxyapatite cryogel scaffold. — *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.*, 2013, **23**, 767.
120. *Ninan N., Muthiah M., Yahaya N.A.B., Park I.-K., Elain A., Wong T.W., Thomas S., Grohens Y.* Antibacterial and wound healing analysis of gelatin/zeolite scaffolds. — *Coll. Surf. B. Biointerfaces*. 2014, **115**, 244.
121. *Majia K., Dasgupta S., Kundub B., Bissoyi A.* Development of gelatin-chitosan-hydroxyapatite based bioactive bone scaffold with controlled pore size and mechanical strength. — *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2015, **26**, 1190.
122. *Jugra M., Dainiak M.B., Saenowska A., Jablonska A., Tripathi A., Plieva F.M., Savina I.N., Strojek L., Jungvid H., Kumar A., Lukomska B., Domanska-Janik K., Forraz N., Mc Guckin C.P.* The performance of laminin-containing cryogel scaffolds in neural tissue regeneration. — *Biomaterials*, 2011, **32**, 3423.
123. *Mu C., Li X., Zhao Y., Zhang H., Wang L., Li D.* Freezing/thawing effects on the exfoliation of montmorillonite in gelatin-based bionanocomposite. — *J. Appl. Polym. Sci.*, 2013, **128**, 3141.
124. *Yazdimaghani M., Vashae D., Assefa S., Walker K.J., Madihally S.V., Khler G.A., Tayebi L.* Hybrid macroporous gelatin/bioactive-glass/nanosilver scaffolds with controlled degradation behavior and antimicrobial activity for bone tissue engineering. — *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2014, **10**, 911.

125. *De Clerck E, Gevers D, De Ridder K, De Vos P.* Screening of bacterial contamination during gelatine production by means of denaturing gradient gel electrophoresis, focussed on *Bacillus* and related endospore-forming genera. — *J. Appl. Microbiol.*, 2004, **96**, 1333.
126. *Лозинский В.И., Кулакова В.К., Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Еришов А.Г., Суханов Ю.В.* Композиция для формирования макропористого носителя, используемого при трехмерном культивировании клеток животных или человека, и способ получения указанного носителя. — Пат. РФ № 2594427 (2015); Б.И. № 23 (2016).
127. *Lozinsky V.I., Kulakova V.K., Ivanov R.V., Petrenko A.Y., Rogulska O.Y., Petrenko Y.A.* Cryostructuring of polymer systems. 47. Preparation of wide porous gelatin-based cryostructurates in sterilizing organic media and assessment of the suitability of thus formed matrices as spongy scaffolds for 3D cell culturing. — *e-Polymers*. 2018, **18**, 175.
128. *Романова Н.А., Бровко Л.Ю., Угарова Н.Н.* Сравнение методов экстракции внутриклеточного АТФ микроорганизмов различного типа для биоллюминесцентного определения клеток микроорганизмов. — *Прикл. Биохим. Микробиол.*, 1997, **33**, 334.
129. *Chaudhary J.P., Nataraj S.K., Gogda A., Meena R.* Bio-based superhydrophilic foam membranes for sustainable oil-water separation. — *Green Chem.*, 2014, **16**, 4552.
130. *Dubruel P., Unger R., Van Vlierberghe S., Cnudde V., Jacobs P.J., Schacht E., Kirkpatrick C.J.* Porous gelatin hydrogels: 2. In vitro cell interaction study. — *Biomacromol.*, 2007, **8**, 338.
131. *Kuhn W., Peterli E., Majer H.* Freezing point depression of gels produced by high polymer networks. — *J. Polym. Sci.*, 1955, **16**, 539.
132. *Kuhn W., Bloch R., Moser P.* Das beim gefrieren von gelen entstehende eis. — *Experientia*. 1962, **18**, 197.



## Глава 5

### Гибридные наноформы антибактериальных веществ в биополимерных матрицах

*Шабатина Т.И.<sup>1</sup>, Верная О.И.<sup>1</sup>, Нурждина А.В.<sup>1</sup>, Шабатин В.П.<sup>1</sup>, Семенов А.М.<sup>1</sup>, Лозинский В.И.<sup>2</sup>, Мельников М.Я.<sup>1</sup>*

Создание новых лекарственных препаратов, включающее их синтез и вывод на фармацевтический рынок, требует больших временных, финансовых и трудовых затрат. Поэтому последние два десятилетия появилось большое число работ, направленных на создание новых лекарственных форм, позволяющих повысить эффективность и безопасность «старых» проверенных лекарств с помощью различных методов, таких как индивидуализация лекарственной терапии, контроль дозы, побочного и терапевтического эффекта лекарств.

Адресная доставка лекарственных веществ и их контролируемое выделение в очаге поражения, в том числе создание лекарственных препаратов пролонгированного действия, становятся все более и более актуальными [1–4]. Оптимальная лекарственная форма должна обеспечивать наличие лекарственного вещества только в органе мишени необходимое время, причем содержание этого вещества должно быть выше минимально эффективной концентрации и ниже минимальной токсической концентрации.

В настоящее время работы, направленные на создание систем доставки лекарств непосредственно к патологическому очагу, проводятся путем связывания молекул лекарственного вещества и ряда других молекул (векторов), обладающих сродством к определенным клеткам, а также путем включения молекул лекарства в «биоактивные» капсулы или закрепления их на различных носителях.

Для направленной доставки в опухолевые клетки используют различные векторы: белки  $\alpha$ -фетопротейн ( $\alpha$ -ФР) и трансферрин, обладающие сродством к поверхности раковых клеток; пептидный гормон гонадолиберин, способный направить лекарственный препарат к опухолевым клеткам

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук

молочной железы, яичников и простаты; моноклональные антитела к различным рецепторам на поверхности раковых клеток [5].

В качестве векторов для направленной доставки лекарственных веществ при лечении наследственных и инфекционных заболеваний используются вирусные частицы, которые обеспечивают избирательность доставки генетического материала в строго определенные ткани и клетки, поскольку каждый вирус способен репродуцироваться только в клетках определенного типа. К недостаткам данных векторов относится то, что они способны активировать онкогены и блокировать опухолевые супрессорные гены в инфицированных клетках, а также способны продуцировать токсичные вирусные белки и вызывать сильный иммунный ответ [5].

Направленная доставка лекарственных препаратов может быть осуществлена за счет использования магнитных неорганических наночастиц. К органу мишени системы направленной доставки на основе наночастиц магнетита и маггемита нацеливаются магнитным полем. В случае онкологических заболеваний лекарственные формы на основе магнитных частиц также используются для магнитной гипертермии (метода локального нагревания опухолевой ткани до температуры порядка 42–46 °С с помощью магнитных частиц, подвергаемых воздействию внешнего магнитного поля). Комбинированное применение гипертермии с химиотерапией (термохимиотерапия) дает существенное усиление противоопухолевого эффекта ряда препаратов [6].

В качестве носителей лекарственных препаратов в настоящее время рассматриваются полимеры, углеродные нанотрубки, фуллерены, наночастицы золота, силикагель, мицеллы, липосомы, эритроциты, лейкоциты.

Полимерные носители [7] обладают большой универсальностью как по структуре, так и по физико-химическим свойствам. Основной причиной этой универсальности является большое разнообразие мономеров, которые могут использоваться для формирования полимерных структур. Некоторые из обычно используемых структур в качестве наноносителей включают полимерсомы и циклодекстринсодержащие полимеры. Полимерсомы структурно похожи на липосомы, но они образованы из амфифильных блок-сополимеров. Циклодекстринсодержащие полимеры представляют собой полимеры, которые содержат молекулы циклодекстрина в структуре ядра или присоединены в виде боковых цепей.

Кроме того, некоторые полимеры содержат химические группы, которые обладают способностью взаимодействовать с окружающей средой, что приводит к изменению свойств самого полимера в целом. Эти полимеры называют чувствительными или «умными» полимерами. За счет новых химических групп можно менять оптическую прозрачность, проводимость, химический состав поверхности, форму, проницаемость, механи-

ческие свойства полимерных носителей. «Умные» полимеры реагируют на такие факторы окружающей среды, как pH, ионная сила, определенные химические вещества, механическое напряжение, температура, электромагнитное излучение и электрическое поле. Эти изменения приводят к высвобождению терапевтических средств. Более подробно об «умных» полимерах написано в обзорах [8–9]. Гидрофобные, гидрофильные и электростатические взаимодействия осуществляются между самими полимерами, полимерами и терапевтическими средствами, полимерами и молекулами присоединения, чтобы оптимизировать нацеливание, биосовместимость и формировать более стабильные структуры для повышения эффективности наноносителя.

Одной из разновидностей полимерных носителей являются дендримеры. Дендримеры — это разветвленные структуры, идущие от ядра. Они имеют однородную форму с четко определенным размером, внутренними пустотами и множеством поверхностных концевых групп. Дендримеры могут быть сформированы методом дивергентного роста, методом конвергентного роста или их комбинацией [10]. Метод дивергентного роста начинается с ядра инициатора. Ядро обычно содержит как минимум две функциональные группы для присоединения дополнительных мономеров. Присоединяющиеся мономеры также содержат по меньшей мере два реакционноспособных участка на молекулу. Дополнительные реагенты для присоединения могут быть добавлены для «роста дендримера». Конвергентный метод начинается с единицы внешней поверхности дендримера, и его формирование происходит аналогичным образом, но рост идет к центру сходящейся структуры. Большое количество поверхностных групп, доступных для прикрепления модификаторов, является идеальной ситуацией для целевой доставки лекарств.

Липосомы состоят из липидных или фосфолипидных молекул, содержащих гидрофильную и гидрофобную области, которые агрегированы вместе, образуя закрытую двухслойную частицу с водным центром и липидной мембраной. Липосомы привлекают внимание в качестве терапевтических носителей более 40 лет и изучаются в качестве носителей для противораковых лекарств, противогрибковых препаратов, анальгетиков и генной терапии, а также для вакцин [11]. Они дают возможность доставлять как гидрофильные лекарственные средства (в водном центре), так и жирорастворимые лекарственные средства (в структуре бислоя). Этот вид терапевтической нагрузки не занимает поверхностные функциональные группы, которые могут быть дополнительно использованы для присоединения целевых лигандов и/или агентов биосовместимости, таких как ПЭГ, хитозан, шелк-фиброин и поливиниловый спирт (ПВС). Эти агенты создают скрытые липосомы — липосомы, которые избегают поглощения мо-

нонуклеарной фагоцитарной системой, таким образом увеличивая время циркуляции.

Другими материалами, которые начинают активно использоваться в области наномедицины, являются фуллерены и углеродные нанотрубки. Хотя они не являются водорастворимыми, их можно обрабатывать кислотами для создания концевых карбоксильных групп [12] или можно ковалентно присоединить ковалентные гидрофильные группы к их поверхности [12, 13] посредством функционализации для увеличения растворимости и времени циркуляции. Хотя предварительные исследования показывают многообещающие результаты для углеродных наноматериалов, для них еще не получены данные о биосовместимости и токсичности.

Мезопористые кремнеземные материалы интересны для наномедицины, так как они обладают благоприятными химическими свойствами, термической стабильностью и биосовместимостью [14]. Уникальная мезопористая структура кремнезема облегчает эффективную загрузку лекарств и их последующее контролируемое высвобождение в очаге поражения. Свойства мезопористого вещества, включая размер пор, высокую загрузку лекарственного средства и пористость, а также свойства поверхности, могут изменяться в зависимости от добавок, используемых для приготовления кремнеземов. Активная поверхность позволяет менять свойства поверхности носителя и связывать терапевтические молекулы. Кремнеземы широко используются в области диагностики, целевой доставки лекарств и биосенсорики клеточного поглощения.

Золотые наночастицы [7] — кандидаты в носители для доставки небольших молекул лекарств или биомолекул, таких как белки, или РНК или ДНК, в клетки-мишени. Преимущества наночастиц золота по сравнению с другими агентами для доставки включают в себя: легкость приготовления монодисперсных частиц размером от 1 до 150 нм; нетоксичность золотого ядра; легкая функционализация малых молекул или нуклеиновых кислот посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий; и способность высвобождать прикрепленное лекарственное средство в отдаленных местах, используя их фотофизические свойства.

Отдельным направлением является разработка систем доставки, в которых в качестве носителей используются естественные контейнеры элементы крови (эритроциты и лейкоциты) человека или животных [5], объединенные с соответствующими аптителами с клеткам-мишеням. Достоинствами эритроцита как носителя лекарственных препаратов являются: высокая степень биологической совместимости, способность к биологическому разложению и, как следствие, отсутствие токсических продуктов деградации; длительность циркуляции в кровотоке. К недостаткам применения эритроцита в качестве микроконтейнера для направленного транс-

порта лекарств является его сравнительно большой объем (около  $90 \text{ мкм}^3$ ). Механизм действия лейкоцитарных носителей основан на том, что после насыщения лекарственными веществами и возврата в кровоток лейкоциты мигрируют непосредственно в очаг воспаления, где после своего разрушения высвобождают лекарственный препарат.

Высвобождение лекарств имеет решающее значение для эффективности лечения и лучшего соблюдения пациентом режима лечения. Основной целью фармакокинетической модуляции является выполнение наименьшего количества манипуляций инвазивного введения при сохранении терапевтического эффекта.

Лекарственные формы с модифицированным (контролируемым) высвобождением — это препараты, скорость и периодичность высвобождения активных ингредиентов которых отличаются от таковых лекарственной формы с немедленным единовременным высвобождением, вводимой тем же путем. Такая намеренная модификация достигается за счет специального состава и методов производства [15–17].

Активные системы контролируемого высвобождения лекарств позволяют управлять дозировкой, временем, а иногда и местом высвобождения лекарств после введения в организм [18–21]. После разработки они могли бы охватывать такие области применения, как гормонотерапия, имплантационная хирургия и поставка ускорителей иммунизации. Самая первая разработанная система недавно достигла стадии испытаний на людях [22]. Прорыв может произойти, если сами препараты будут изготовлены из материала, чувствительного к изменениям окружающей среды: который в ответ на изменение контролируемых параметров обеспечивает постепенное высвобождение лекарственных средств.

К преимуществам форм пролонгированного действия относятся снижение колебаний плазменной концентрации лекарственных препаратов, снижение частоты и интенсивности нежелательных лекарственных реакций. Кроме того, эти формы более удобны для пациентов, так как требуют меньшей частоты введения [23].

К пролонгированным лекарственным формам предъявляются ряд требований:

- Вспомогательные вещества, введенные в лекарственную форму, должны полностью выводиться из организма или инактивироваться;
- Способы пролонгирования должны быть простыми и доступными в исполнении и не должны оказывать отрицательного воздействия на организм;
- Физическая стабильность в крови;
- Высокая стабильность при хранении.

В зависимости от кинетики процесса различают лекарственные формы:

- с периодическим (пульсирующим) высвобождением (при введении которых в организм лекарственное вещество высвобождается порциями).
- с непрерывным высвобождением (при введении которых высвобождение лекарственного препарата происходит с постоянной скоростью, обеспечивающей постоянство желаемой терапевтической концентрации).
- с отсроченным высвобождением (при введении которой в организм высвобождение лекарственного вещества начинается позже и длится дольше, чем из обычной лекарственной формы).

Существует два основных подхода к высвобождению пульсирующих лекарств: пассивная и активная системы. В пассивных системах [24–25] скорость высвобождения, последовательность импульсов высвобождения или иногда пространственный контроль над высвобождением лекарственного средства программируется при изготовлении системы и не может быть изменена. Системы непрерывного и отсроченного высвобождения лекарств с запрограммированной постоянной скоростью их высвобождения также могут рассматриваться как пассивные. Системы активного высвобождения [26–29] лекарств обеспечивают средства для контроля параметров высвобождения в любое время после имплантации системами управления — триггерами. Составные части активной системы выпуска обычно включают резервуар с лекарственным средством, привод и клапаны, контролирующие выпуск. Недавно было опубликовано первое исследование на человеке имплантированного микрочипа [29], содержащего 20 микрорезервуаров, каждый с беспроводным управлением, показавшее перспективность и ориентированность на пациента таких систем. Однако размещение батареи контейнеров с лекарственными препаратами и системы управления требует относительно большого пространства, которое ограничивает имплантацию устройства только подкожной областью. Поэтому актуальны новые подходы к развитию этого направления.

Лекарственные формы, с непрерывным высвобождением, могут быть получены путем связывания фармакологически активного компонента с матрицей полимера, которая обеспечивает постепенный выход из нее лекарственного вещества и длительное поддержание необходимой концентрации действующего препарата в организме или локально в определенном органе-мишени [30–35]. В качестве полимерных матриц используют

- Синтетические полимеры: поли(алкилцианоакрилат), поли(алкилметилакрилат), поли(стирол), поли(винилпиридин), поли(капролактон), полимолочная кислота [36–43];

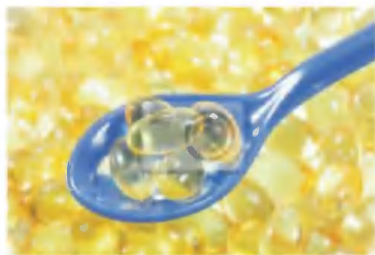
- Природные полимеры: альбумин [44–45], казеин [46], пептиды [47–48], желатин [49–50], альгинаты [49–55], хитозан [56–60].

Целью настоящей работы являлся синтез гибридных нанокомпозитов на основе антибактериальных препаратов (диоксилина, гентамицина сульфата) и наночастиц металлов (серебра, меди), включение полученных систем в альгинатные, желатиновые, БСА и хитозановые криоструктураты (КС), способные обеспечить их пролонгированное выделение, а также определение антибактериальной активности полученных гибридных лекарственных наночастиц в отношении бактериальных клеток.

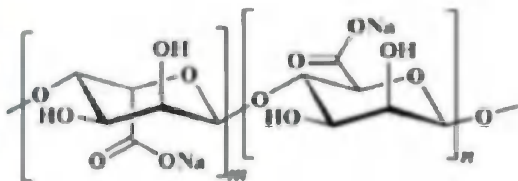
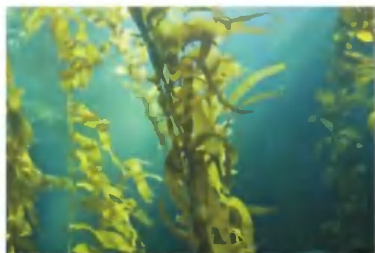
## 5.1. Синтез гибридных наночастиц

Низкотемпературный синтез желатиновых, БСА, хитозановых и Са-альгинатных КС проводили согласно [61–64] с использованием различных сшивающих агентов формальдегида, диметиламинопропил- $N'$ -этилкарбодимид, аммиака, глутарового альдегида и хлорида кальция соответственно. Структурные формулы биополимерных молекул приведены ниже.

Желатин



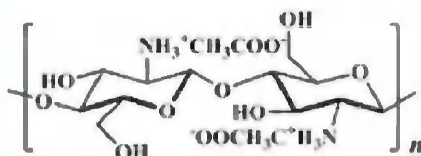
Альгинат натрия из бурых водорослей



### Бычий сывороточный альбумин (БСА)



### Хитозан из панцирей ракообразных



Включение наночастиц металлов, лекарственных препаратов и наноконструктурированные биополимерные матрицы проводили следующим образом [65–70]: губчатые диски биополимеров погружали на 30 минут в водные растворы диоксида (соответствующего фармакопейной статье 42-2308-97) или гентамицина сульфата (соответствующего фармакопейной статье 42-2626-89) и наночастиц металлов: серебра марки КНД-С-К (ТУ 9154-024-74107096-2008) и меди (1 масс.% лекарственного препарата, 0,02 масс.% Ag или 0,02 масс.% Cu), затем диски извлекали из раствора, замораживали жидким азотом и подвергали криосублимационной сушке в течение 24 часов. Наночастицы меди получали восстановлением высокодисперсного безводного формата меди водородом при 180 °С в течение 90 минут [71] и восстановлением водного раствора хлорида меди гидразинагидратом [72].

Полученные образцы на основе альгината кальция (Ag/антибактериальный препарат/альгинат, Cu/антибактериальный препарат/альгинат) содержали 14,3 масс.% диоксида или гентамицина сульфата и 0,9 масс.% металла, на основе желатина (Ag/ антибактериальный препарат/желатин, Cu/антибактериальный препарат/желатин) содержали 11,5 масс.% диоксида или гентамицина сульфата, 0,4 масс.% металла, на основе БСА (Ag/антибактериальный препарат/БСА, Cu/антибактериальный препарат/



БСА) содержали 7,4 масс.% диоксидина или гентамицина сульфата, 1 масс.% металла, на основе хитозана (Ag/антибактериальный препарат/хитозан, Cu/антибактериальный препарат/ хитозан) содержали 4,8 масс.% диоксидина или гентамицина сульфата, 1,5 масс.% металла (согласно данным атомной абсорбции, УФ-спектроскопии и кондуктометрии). Содержание металлов в криоструктурах определяли атомно-абсорбционным методом на атомно-абсорбционном спектрометре THERMO FISHER SCIENTIFIC серии iCE 3000 и программным обеспечением SOLAAR.

Для гибридных композитов Cu/диоксидин/альгинат использовали наночастицы меди, полученные восстановлением безводного формата меди водородом с размером частиц 5–50 нм, а для других медьсодержащих систем использовали наночастицы меди, полученные восстановлением хлорида меди гидразинагидратом со средним размером частиц 6–9 нм.

## 5.2. Структурная и спектральная характеристика криоформируемых гибридных наносистем

Микрофотографии СЭМ (рис. 5.1), полученные на растровом электронном микроскопе Phenom (FEI Company, Германия) при увеличениях  $\times 20$ – $\times 4000$ , свидетельствуют о том, что используемые в качестве носителей для антибактериальных препаратов и наночастиц металлов криоструктурированные биополимерные системы представляют собой широкопористые матрицы с размером пор в десятки микрон.

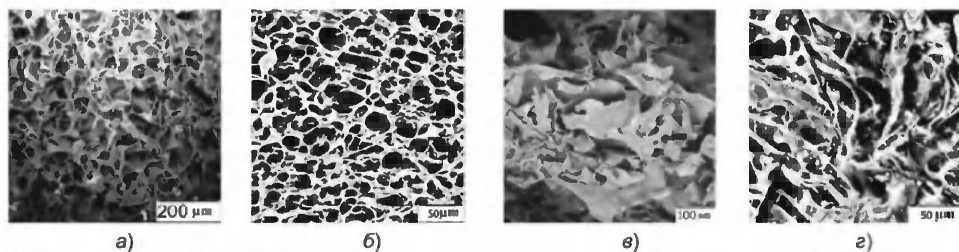


Рис. 5.1. СЭМ микрофотографии криоструктурированных Са-альгинатной (а), желатиновой (б), БСА (в), хитозановой (з) биополимерных матриц

Включение антибактериальных препаратов и наночастиц металлов не оказывает существенного влияния на размер их пор, что свидетельствует в пользу того, что включенные в биополимерные криоструктураты диоксидин и гентамицина сульфат находятся в порах биополимерных матриц

в высокодисперсной форме. ПЭМ микрофотографии, полученные на электронном микроскопе LEO 912 AB Omega (ZEISS, Germany) при увеличениях 80–500 000 гибридных биополимерных материалов, включающих нанокомпозиты диоксида и/или сульфата гентамицина и наночастицы серебра, приведены на рис. 5.2, а микрофотографии гибридных биополимерных материалов, включающих нанокомпозиты диоксида и/или сульфата гентамицина и наночастицы меди, на рис. 5.3.

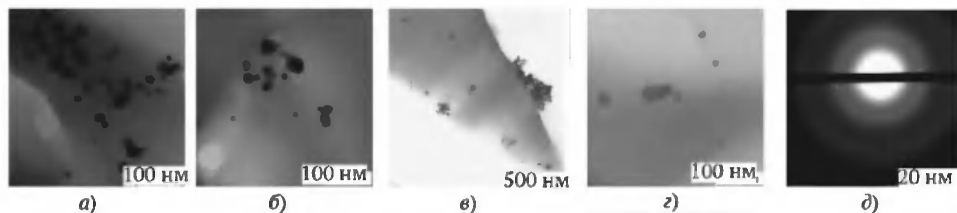


Рис. 5.2. Микрофотографии (просвечивающая электронная микроскопия) наночастиц серебра внутри альгинатного (а), желатинового (б), БСА (в), хитозанового (г) КС и их электронная дифрактограмма (д)

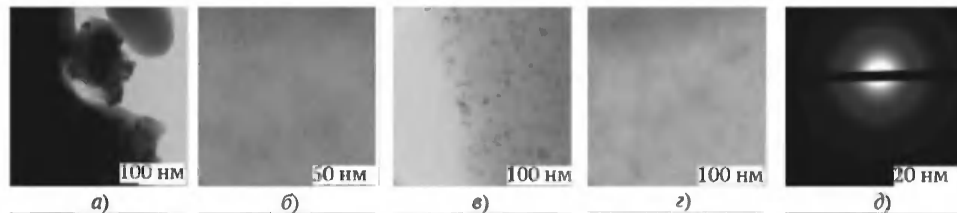


Рис. 5.3. Микрофотографии (просвечивающая электронная микроскопия) наночастиц меди внутри альгинатного (а), желатинового (б), БСА (в), хитозанового (г) КС и их электронная дифрактограмма (д)

В УФ-спектрах водных экстрактов образцов Ag/диоксидин/КС, Cu/диоксидин/КС, полученных на спектрофотометре Jasco V-770 (Jasco, Япония) в интервале 200–700 нм. присутствовали полосы при 250 нм и 375 нм, соответствующие диоксидину, Фурье-ИК-спектры гибридных систем Ag/диоксидин/КС, Cu/диоксидин/КС, Ag/гентамицина\_сульфат/КС, Cu/гентамицина сульфат/КС, полученные в интервале 4000–400 см<sup>-1</sup> на спектрометре Bruker Tensor II (Германия) с приставкой ATR platinum, по методике диффузного отражения, представляли собой суперпозицию ИК-спектров высокодисперсной кристаллической β-формы криодиоксида [61] или сульфата гентамицина и пиков характеристических полос используемой биополимерной матрицы (рис. 5.4, 5.5).

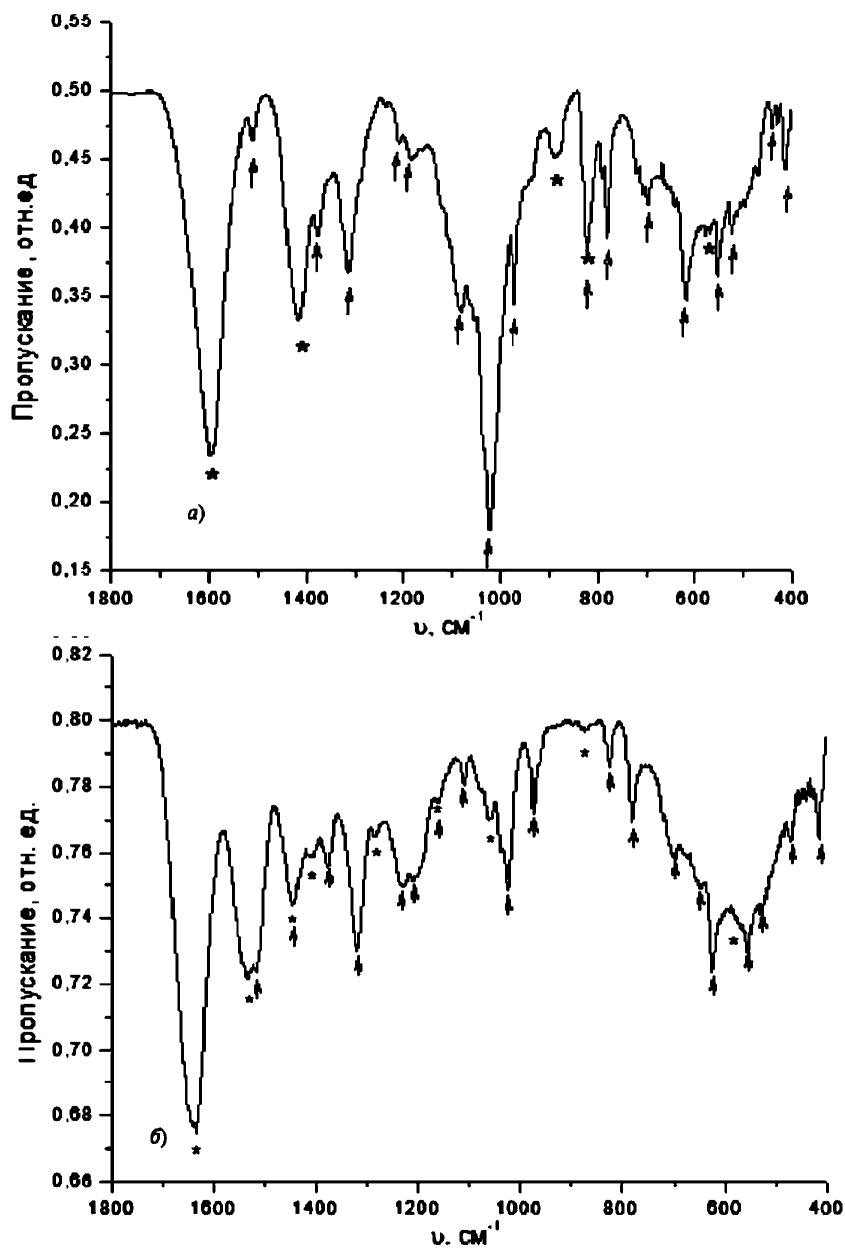


Рис. 5.4. ИК-спектры криоструктурированных матриц Са-альгината (а), желатина (б) (\* — криоструктурат, ↑ — диоксидин)

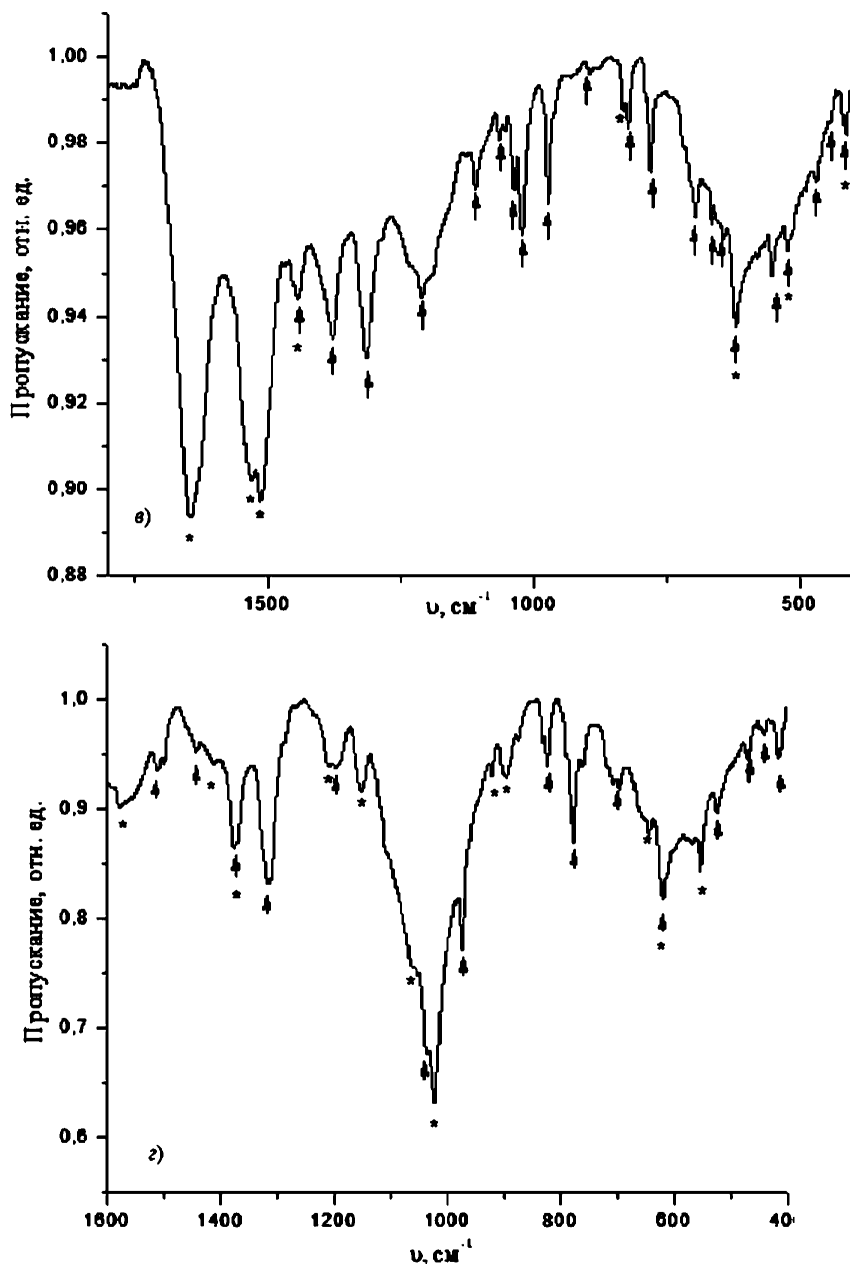


Рис. 5.4 (окончание) ИК-спектры криоструктурированных матриц БСА (а), хитозана (з) после включения диосквицина (\* – криоструктурат, ↑ – диосквицин)

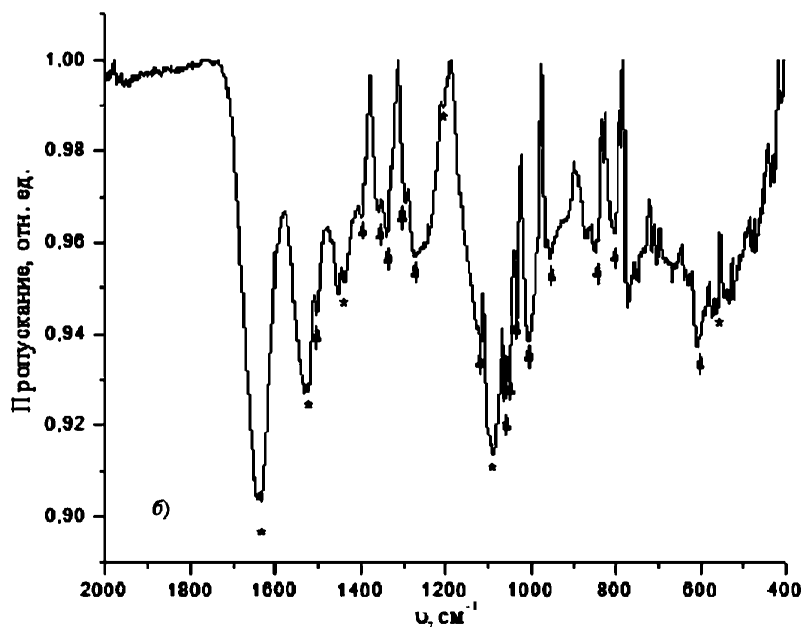
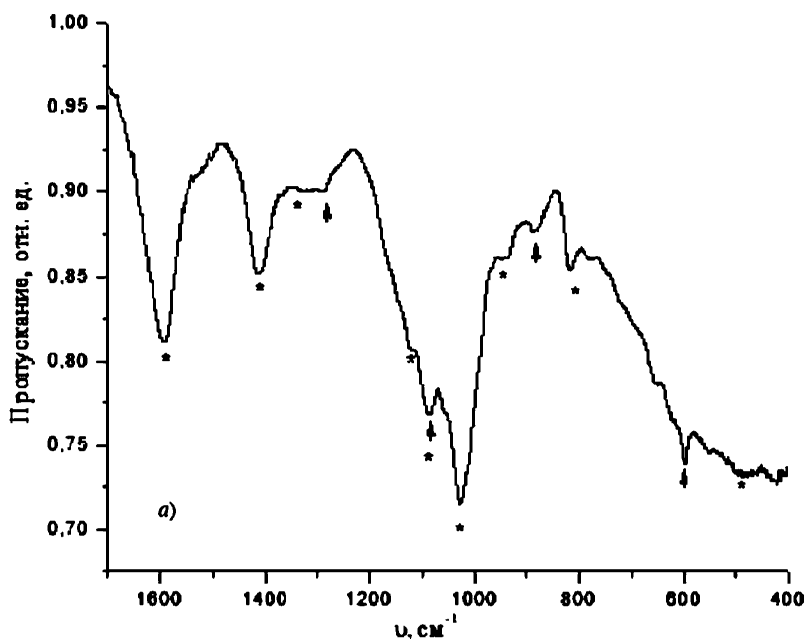


Рис. 5.5. ИК-спектры криоструктурированных матриц Са-альгината (а), желатина (б) (\* — криоструктурированная матрица биополимера, ↑ — гентамицина сульфат)

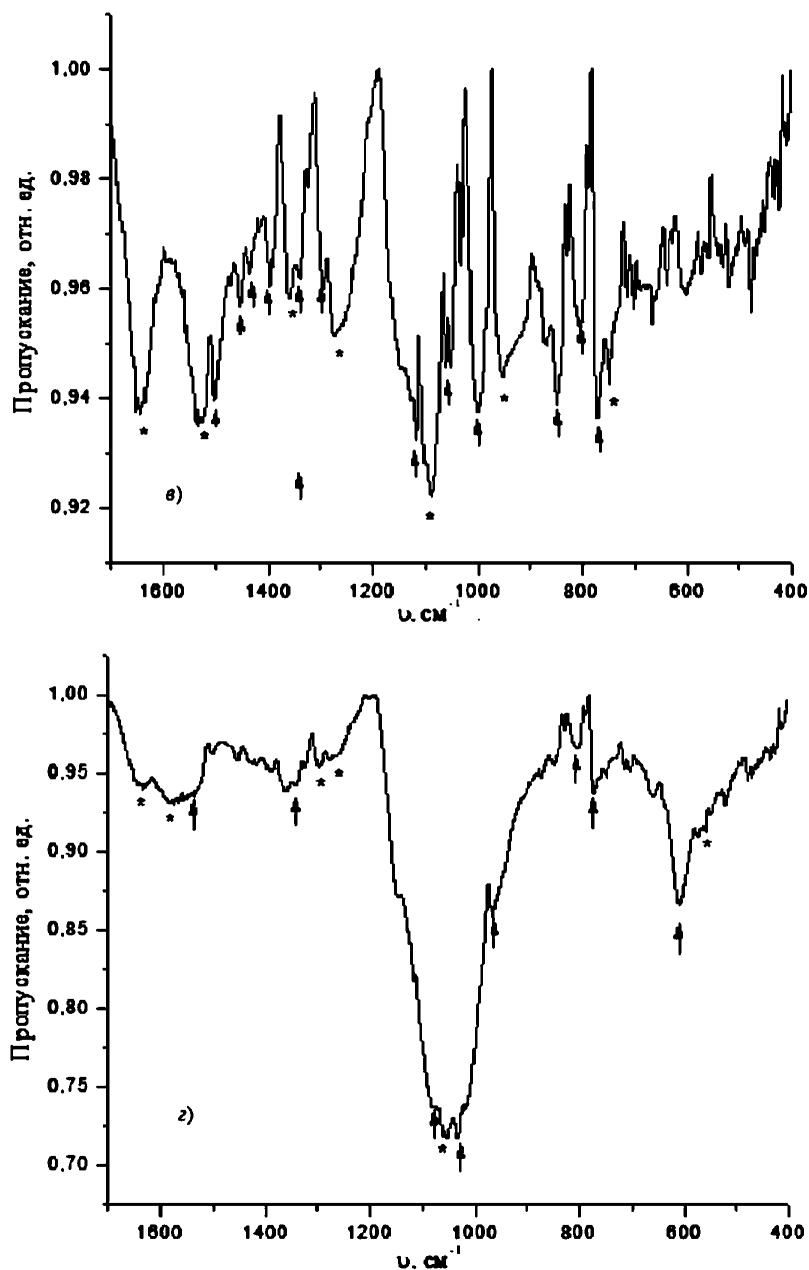


Рис. 5.5 (окончание) ИК-спектры криоструктурированных матриц БСА (а), хитозана (з) после включения диоксидина (\* – криоструктурат, ↑ – диоксидин)

Полученные данные однозначно свидетельствуют о включении высокодисперсных частиц гибридных композитов рассматриваемых антибактериальных препаратов диоксидина и сульфата гентамицина с наночастицами серебра и меди в совместную структуру с криоформирующейся биополимерной матрицей.

### 5.3. Антибактериальная активность гибридных наноформ и кинетика высвобождения лекарственных компонентов из биополимерных матриц

Определение антибактериальной активности гибридных систем Ag/диоксидин/КС, Cu/диоксидин/КС, Ag/гентамицина сульфат/КС, Cu/гентамицина сульфат/КС в сравнении с диоксидином, гентамицина сульфатом и наночастицами серебра и меди, включенными в КС, осуществляли диск-диффузионным методом [73], с использованием дисков КС диаметром 4 и высотой 2 мм. В качестве тест-культур использовали бактериальные клетки, полученные из коллекции бактериальных культур кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: *E. coli* 52, *S. aureus* 144. Эксперименты проводили в чашках Петри, содержащих 20 мл агаризованной питательной среды, подсушенной в течение суток (толщина слоя среды 4 мм). Измерение зон задержки роста (ЗЗР) тест-культур проводили через 16 часов инкубации. Статистически достоверные результаты получали девятикратным повторением измерений ЗЗР для каждой серии образцов. Полученные данные обобщены в табл. 5.1. Включение наночастиц металлов, антибактериальных препаратов и гибридных систем на их основе в КС на основе желатина, альгината и БСА не приводит к изменению установленной для гибридных наноформ закономерности возрастания их антибактериальной активности [65–70]. Зона задержки роста (ЗЗР) наночастицы металлов меньше ЗЗР антибактериальный препарат/криоструктурат меньше ЗЗР Cu/антибактериальный компонент/криоструктурат меньше ЗЗР Ag/антибактериальный препарат/криоструктурат. При этом активность каждой из систем меняется в зависимости от природы матрицы и включенного в него антибактериального препарата.

Кинетику высвобождения из криоструктуратов гентамицина сульфата отслеживали кодуктометрически на TDSметре Mettler Toledo (Китай) с электродом LE703. Кинетику высвобождения диоксидина из криоструктуратов отслеживали спектрофотометрически на спектрофотометре Jasco V-770 (Jasco, Япония) при  $\lambda = 360$  нм. Высвобождение антибактериального препарата из альгинатной матрицы протекает за 40 минут, из желатиновой — за 60, из БСА матрицы за 120 минут. Высвобождение антибактери-

Таблица 5.1. Зона задержки роста бактериальных штаммов вокруг дисков альгинатных и желатиновых криоструктуратов, пропитанных антибактериальными препаратами, наночастицами металлов и их гибридными нанокомпозитами, включенными в криоструктурированные биополимерные матрицы

Криоструктурат на основе	Компоненты, включенные в криоструктурат	E. coli 52, 3ЗР, мм	S. aureu 144, 3ЗР, мм
альгината	Ag	10,0 ± 0,6	0
	Cu	0	0
	диоксидин	20,0 ± 0,6	17 ± 0,6
	Диоксидин Ag	23,0 ± 0,8	32 ± 0,8
	Диоксидин Cu	22,1 ± 1,2	23 ± 0,6
	Гентамицина сульфат	23,0 ± 0,6	18 ± 0,6
	Гентамицина сульфат Ag	28 ± 0,6	21 ± 0,6
желатина	Ag	4 ± 1,2	0
	Cu	0	0
	диоксидин	35 ± 0,6	10 ± 0,6
	Диоксидин Ag	38 ± 1,2	15 ± 0,6
	Диоксидин Cu	37 ± 1,2	14 ± 0,6
	Гентамицина сульфат	32 ± 0,6	21 ± 0,6
	Гентамицина сульфат Ag	34 ± 1,2	24 ± 0,6
BCA	Ag	0	0
	Cu	0	0
	диоксидин	16,7 ± 0,6	20,9 ± 0,7
	Диоксидин Ag	20,6 ± 0,5	29,0 ± 2,0
	Диоксидин Cu	18,2 ± 1,2	23,1 ± 0,8
	Гентамицина сульфат	11,7 ± 0,6	23,5 ± 0,5
	Гентамицина сульфат Ag	18,0 ± 0,5	28,0 ± 1,0
хитозана	Ag	7 ± 1,0	6,6 ± 0,5
	Cu	0	0
	диоксидин	33,2 ± 1,6	11,5 ± 2,5
	Диоксидин Ag	23,4 ± 1,2	7,5 ± 0,6
	Диоксидин Cu	22,0 ± 1,2	6,5 ± 0,5
	Гентамицина сульфат	29,0 ± 1,0	24,0 ± 0,2
	Гентамицина сульфат Ag	28,3 ± 1,4	23,0 ± 1,3
	Гентамицина сульфат Cu	28,3 ± 0,8	22,5 ± 0,5

альных препаратов из хитозановой матрицы протекает почти трое суток. Полученные данные согласуются с результатами по антибактериальной активности полученных гибридных систем и подтверждают наличие более сильных специфических взаимодействий между хитозановой матрицей и антибактериальным препаратом, чем в случае других матриц. Однако полное высвобождение включенного антибактериального препарата из хитозанового КС в течение трех суток позволяет исключить ковалентное



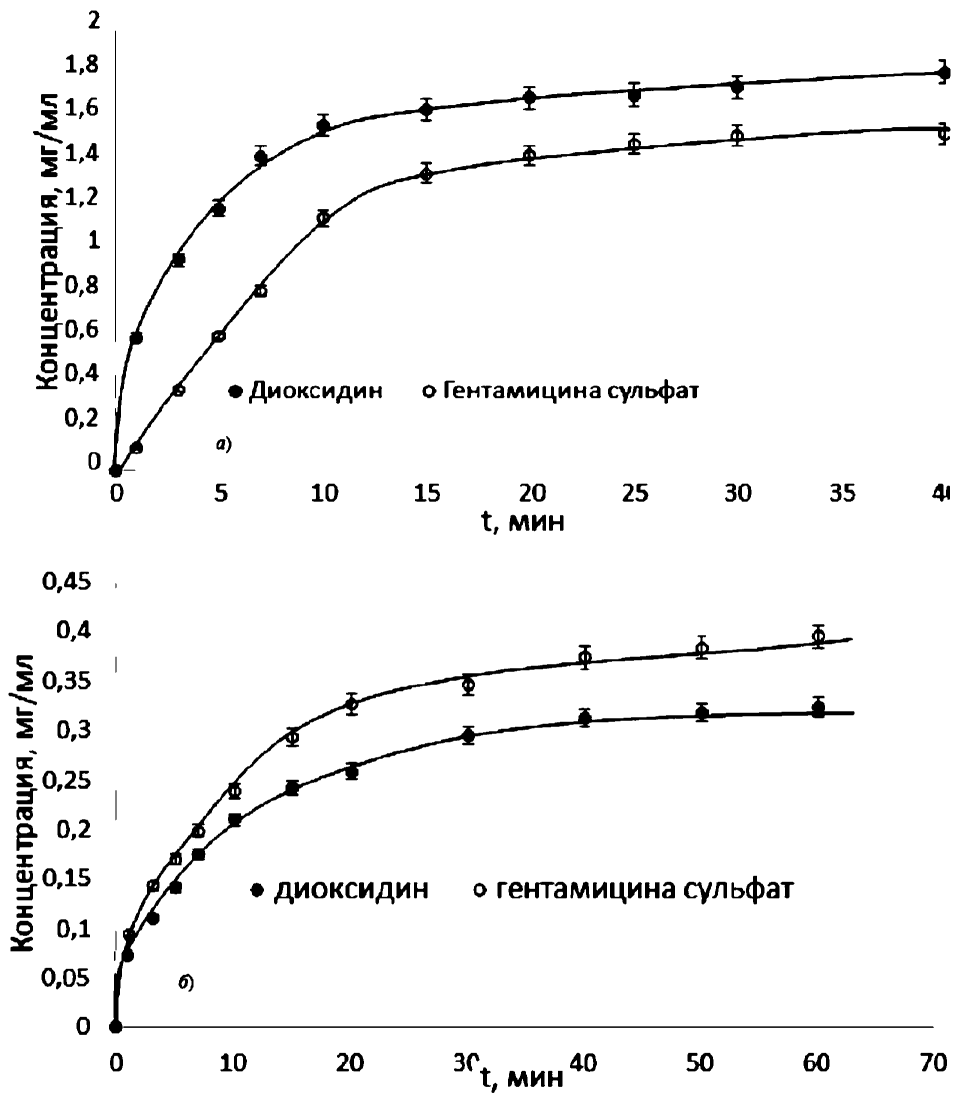


Рис. 5.6. Кинетические кривые высвобождения диоксидина и гентамицина сульфата из криоструктурированных наноформ на основе Са-альгината (а), желатина (б)

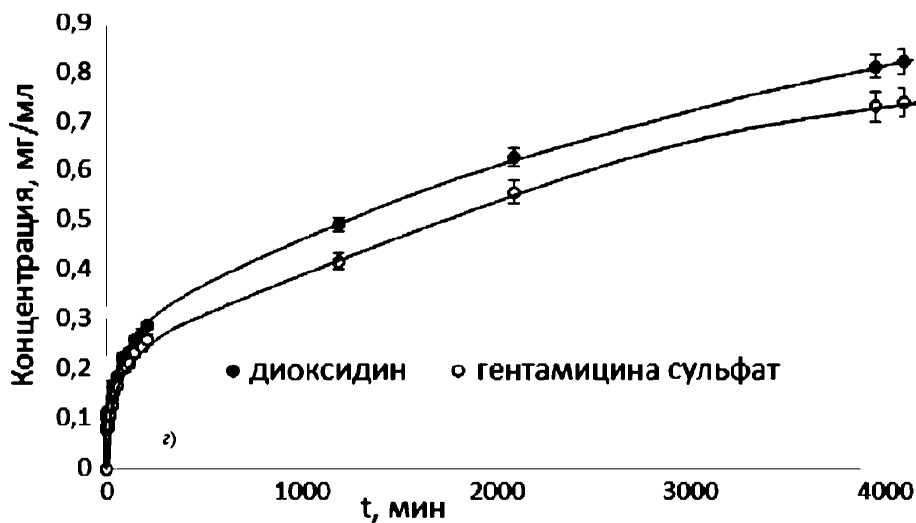
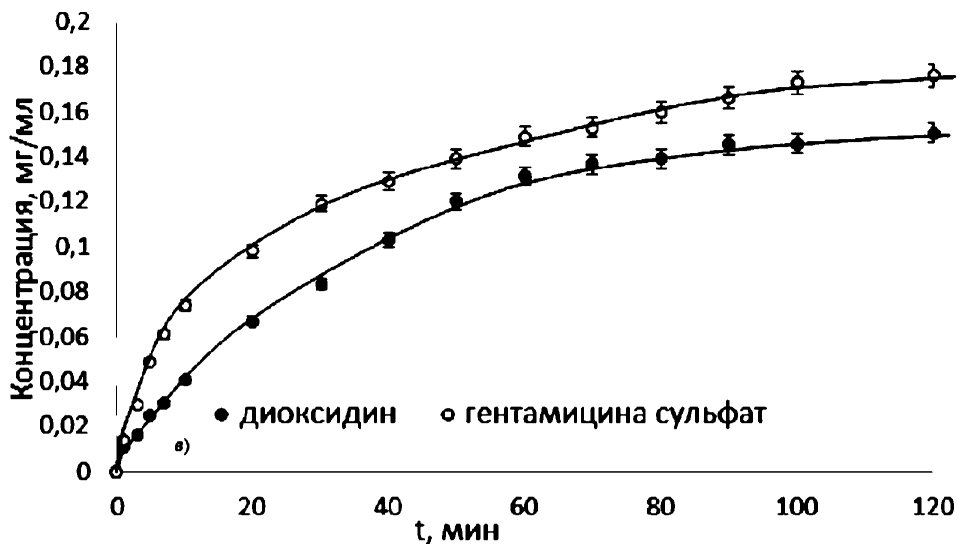


Рис. 5.6 (окончание) Кинетические кривые высвобождения диоксилина и гентамицина сульфата из криоструктурированных наночастиц на основе БСА (в) и хитозана (з)

связывание лекарственных компонентов активными функциональными центрами хитозановой биополимерной матрицы. Таким образом, мы можем в данном случае говорить о достижении пролонгированного действия лекарственных компонентов, включенных в гибридные наночастицы на основе биополимера. Изменение структуры КС за счет варьирования условий

их синтеза может позволить нам в дальнейшем снизить скорость высвобождения антибактериальных препаратов из матриц на основе желатина, альгината и БСА и получить более длительный эффект контролируемого выделения лекарственного компонента.

## Заключение

Методом криохимического синтеза получены новые гибридные наноформы на основе криомодифицированного антибактериального препарата диоксида, с кристаллической структурой, отличной от исходного фармакопейного диоксида, содержащие наноразмерные частицы (со средним размером 5-18 нм) биологически активных металлов (серебро, медь), включенные в криоструктурированные матрицы биополимеров – желатина, БСА, хитозана и альгината кальция.

Гибридные системы, синтезированные в данной работе, показали более высокую активность в отношении *E. coli* 52 и *S. aureus* 144 по сравнению с отдельными компонентами. Совместное действие наночастиц металлов, обладающих бактерицидной активностью (серебро, медь), и частиц криохимически модифицированного диоксида приводит к синергетическому возрастанию антибактериальной активности полученных гибридных нанокомпозигов. Включение полученных гибридных наносистем в биополимерные криоструктуры на основе альгината, желатина, БСА не только не приводит к исчезновению наблюдаемого антибактериального эффекта, но и обеспечивает постепенный выход действующих лекарственных компонентов из широкопористой полимерной матрицы, и, таким образом, пролонгированное действие синтезированных наноформ и гибридных наносистем.

Полученные антибактериальные гибридные нанокомпозигов и включающие их транспортные наноформы и системы перспективны для использования при создании новых лекарственных форм направленной доставки и регулируемого выделения лекарственных компонентов. Разработка и усовершенствование методов формирования криоструктурированных матриц, позволит направленно варьировать структурно-динамические свойства получаемых гибридных материалов и тем самым контролировать концентрацию и кинетику выхода лекарственных компонентов из биосовместимой матрицы-носителя.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 16-13-10365.

## Авторы

**Шабатина Татьяна Игоревна**, д.х.н., ведущий научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Криохимия, химия наноразмерных кластеров и частиц металлов, гибридные наноматериалы, металломезогены, наноформы лекарственных веществ, наноструктурированные пленки.

**Верная Ольга Ивановна**, к.х.н., научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Физическая химия, химическая кинетика, катализ, фармакология, наночастицы металлов, гибридные и композитные материалы, лекарственные препараты, направленная доставка.

**Нуждина Анастасия Вячеславовна**, инженер, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Криохимический синтез, лекарственные субстанции, биополимеры, наночастицы серебра, меди, гибридные наноматериалы.

**Шабатин Владимир Петрович**, к.х.н., старший научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Криохимический синтез и анализ материалов со специальными свойствами, включая нанодисперсные металлы, керметы, оксиды, органические соединения, в том числе, лекарственные субстанции, фитопрепараты, витаминные препараты, криомодифицирование органических соединений.

**Семенов Александр Михайлович**, д. биол. наук, ведущий научный сотрудник МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет. Микробиология, биологическое тестирование лекарственных препаратов, антибиотики.

**Лозинский Владимир Иосифович** д.х.н., профессор, заведующий лабораторией криохимии биополимеров института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН. Криогенные процессы в полимерных системах, явления криоструктурирования и криотропного гелеобразования, криополимеризация, криомодификация и криолиз полимеров, криоденатурация биополимеров, использование криогенно-структурированных полимерных систем в прикладных областях.

**Мельников Михаил Яковлевич**, д.х.н., профессор, заведующий кафедрой Химической кинетики, главный научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Реакции электронно-возбужденных радикалов и ион-радикалов; фотохимия, радиационная химия, кинетика химических реакций в твердой фазе, реакции интермедиатов на поверхности, катализ, фотохимия координационных соединений, фармакология, физическая органическая химия.

## Литература

1. *Краснюк И.Н.* Фармацевтическая технология: Технология лекарственных форм. М.: Издательский центр «Академия», 2004, 464 с.
2. *Холодов Л.Е.* Клиническая фармакинетика. М.: Медицина, 1991, 386 с.
3. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства в 2 томах. М.: Медицина, 1991, 304с.
4. *Милованова Л.Н.* Технология изготовления лекарственных форм. Ростов-на-Дону: Медицина. 2002, 453 с.
5. *Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Оборин В.А., Девришов Д.А., Копылов С.Н.* Направленный транспорт лекарственных препаратов: современное состояние вопроса и перспективы. — Известия Коми научного центра, 2012, 1(9), 46.
6. *Улащик В.С.* Локальная гипертермия в онкологии: использование магнитного поля, лазерного излучения, ультразвука. — Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры, 2014, 2, 48
7. *Webster D.M., Sundaram P., Byrne M.E.* Injectable nanomaterials for drug delivery: Carriers, targeting moieties, and therapeutics. — *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, 2013, **84**, 1.
8. *Traitel T., Goldbart R., Kost J.* Smart polymers for responsive drug-delivery systems. — *J. Biomater. Sci., Polymer Edition*, 2008, **19**, 755.
9. *Qiu Y., Park K.* Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. — *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, **64**, 49.
10. *Nanjwade B.K., Bechra H.M., Derkar G.K., Manvi F.V., Nanjwade V.K.* Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems. — *Europ. J. Pharm. Sci.*, 2009, **38**, 185.
11. *Lian T., Ho R.J.Y.* Trends and developments in liposome drug delivery systems. — *J. Pharm. Sci.*, 2001, **90**, 667.
12. *Bianco A., Kostarelos K., Prato M.* Applications of carbon nanotubes in drug delivery. — *Current Opin. Chem. Biol.*, 2005, **9**, 674.
13. *Dhar S., Liu Z., Thomale J.R., Dai H., Lippard S.J.* Targeted single-wall carbon nanotube-mediated Pt(IV) prodrug delivery using folate as a homing device. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 11467.
14. *Bharti C., U. Nagaich, Pal A.K., Gulati N.* Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. — *Int. J. Pharm. Investig.*, 2015, **5**(3), 124.
15. *Lee J.H., Yeo Y.* Controlled Drug Release from Pharmaceutical Nanocarriers. — *Chem. Eng. Sci.*, 2015, **125**, 75.
16. *Moghanjoughi A.A., Khoshnevis D., Zarrabi A.* A concise review on smart polymers for controlled drug release. — *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2016, **6**(3), 333.
17. *Saranya S., Radha K.V.* Review of Nanobiopolymers for Controlled Drug Delivery. — *Polym. Plastics Technol. Eng.*, 2014, **53**(15), 1636.
18. *Kamaly N., Yameen B., Wu J., Farokhzad O.C.* Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. — *Chem. Rev.*, 2016, **116**(4), 2602.
19. *Li J., Mooney D.J.* Designing hydrogels for controlled drug delivery. — *Nature Rev. Mater.*, 2016, **1**, Article number: 16071.
20. *Vicent M. J., Duncan R.* Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. — *Trends Biotechnol.*, 2006, **24**, 39.
21. *Lin C.C., Metters A.T.* Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. — *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, **58**, 1379.

22. *Kiryukhin M.V.* Active drug release systems: current status, applications and perspectives. — *Current Opinion in Pharmacology*, 2014, **18**, 69.
23. *Perrie Y., Rades T.* *Pharmaceutics: Drug Delivery and Targeting*. — Fasttrack, Canada, 2014, 242p.
24. *Stevenson C.L., Santini J.T.J., Langer R.* Reservoir-based drug delivery systems utilizing microtechnology. — *Adv Drug Deliv Rev.* 2012, **64**, 1590.
25. *Nuxoll E.* BioMEMS in drug delivery. — *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, **65**, 1611.
26. *Pritchard E.M., Kaplan D.L.* Silk fibroin biomaterials for controlled release drug delivery. — *Expert Opin. Drug Deliv.* 2011, **8**, 797.
27. *Herrlich S., Spieth S., Messner S., Zengerle R.* Osmotic micropumps for drug delivery. — *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2012, **64**, 1617.
28. *Kim J.K., Kim H.J., Chung J.Y., Lee J.H., Young S.B., Kim Y.H.* Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery. — *Arch. Pharm. Res.* 2014, **37**, 60.
29. *Farra R., Sheppard N.F.Jr., McCabe L., Neer R.M., Anderson J.M., Santini J.T., Cima M.J., Langer R.* First-in-human testing of a wirelessly controlled drug delivery microchip. — *Sci. Transl. Med.* 2012, **4**, 122ra21.
30. *Ma G., Miao B., Song, C.* Thermosensitive PCL-PEG-PCL hydrogels: synthesis, characterization, and delivery of proteins. — *J. Appl. Polym. Sci.*, 2010, **116**, 1985.
31. *Ankareddi I., Brazel C.S.* Synthesis and characterization of grafted thermosensitive hydrogels for heating activated controlled release. — *Int. J. Pharm.*, 2007, **336**, 241.
32. *Leo E., Scatturin A., Vighi E., Dalpiaz A.* Polymeric nanoparticles as drug controlled release systems: a new formulation strategy for drugs with small or large molecular weight. — *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, **6(9)**, 3070.
33. *Zhang L., Chen J., Han C.* A multicenter clinical trial of recombinant human GM-CSF hydrogel for the treatment of deep second-degree burns. — *Wound Repair. Regen.*, 2009, **17**, 685.
34. *Ishii S., Kaneko J., Nagasaki Y.* Development of a long-acting, protein-loaded, redox-active, injectable gel formed by a polyion complex for local protein therapeutics. — *Biomaterials*, 2016, **84**, 210.
35. *Lei H., Gao X., Wu W.D., Wu Z., Chen X.D.* Aerosol-assisted fast formulating uniform pharmaceutical polymer microparticles with variable properties toward pH-sensitive controlled drug release. — *Polymers*, 2016, **8(5)**, 195.
36. *Shojaei A.H., Paulson J., Honary S.* Evaluation of poly(acrylic acid-co-ethylhexyl acrylate) films for mucoadhesive transbuccal drug delivery: factors affecting the force of mucoadhesion. — *J. Control. Release*, 2000, **67**, 223.
37. *Zhang Y., Wang R., Hua Y., Baumgartner R., Cheng J.* Trigger-responsive poly( $\beta$ -amino ester) hydrogels. — *ACS Macro Lett.*, 2014, **3**, 693.
38. *Sawhney A.S., Pathak C.P., Hubbell J.A.* Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly( $\alpha$ -hydroxy acid) diacrylate macromers. — *Macromolecules*, 1993, **26**, 581.
39. *Neumann K., Lilienkamp A., Bradley M.* Responsive polymeric nanoparticles for controlled drug delivery. — *Polym. Intern.*, 2017, **66(12)**, 1756.
40. *Torkaman M., Kazemabadi F.Z.* The use of ethyl cellulose polymer to control drug release of hydrocortisone acetate. — *Orient. J. Chem.*, 2017, **33(4)**, 1976.
41. *Mulani H.T., Shah N.J.* Development of pH-independent matrix type sustained release drug delivery system of propranolol hydrochloride. — *J. App. Pharm.*, 2011, **1(3)**, 83
42. *Shah N.J.* Development of pH-independent matrix type sustained release drug delivery system of propranolol hydrochloride. — *J. App. Pharm.*, 2011, **1(3)**, 83.

43. *Haik-Creguer K.L., Dunbar G.L., Sabel B.A., Schroeder U.* Small drug sample fabrication of controlled release polymers using the microextrusion method. — *J. Neuroscience Meth.*, 1998, **80(1)**, 37.
44. *Wang W., Wang C.* Polyurethane for biomedical applications: A review of recent developments. — *Design Manufac. Med. Dev.*, 2012, 115.
45. *Gayet J.-C., Fortier G.* High water content BSA-PEG hydrogel for controlled release device: Evaluation of the drug release properties. — *J. Contr. Release*, 1996, **38(2-3)**, 177.
46. *Elzoghby A., Samy W.M., Elgindy N.A.* Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. — *J. Control. Rel.*, **157(2)**, 168.
47. *Elzoghby A.O., El-Fotoh W.S., Elgindy N.A.* Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. — *J. Control. Release*, 2011, **153(3)**, 206.
48. *Altunbas A., Lee S.J., Rajasekaran S.A., Schneider J.P., Pochan D.J.* Encapsulation of curcumin in self-assembling peptide hydrogels as injectable drug delivery vehicles. — *Biomaterials*, 2011, **32**, 5906.
49. *Gwendiren M., Lu H.D., Burdick J.A.* Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. — *Soft. Matter.*, 2012, **8**, 260.
50. *Bini R.A., Silva M.F., Varanda L.C., da Silva M.A., Dreiss C.A.* Soft nanocomposites of gelatin and poly(3-hydroxybutyrate) nanoparticles for dual drug release. — *Coll. and Surf. B: Biointerfaces*, 2017, **157**, 191.
51. *Fang Y.-E., Cheng Q., Lu X.-B.* Kinetics of In Vitro Drug Release from Chitosan/Gelatin Hybrid Membrane. — *Appl. Pol.*, 1998, **68(11)**, 1751-1758.
52. *Jalababu R., Veni S., Reddy K.V.N.S.* Synthesis and characterization of dual responsive sodium alginate-g-acryloyl phenylalanine-poly N-isopropyl acrylamide smart hydrogels for the controlled release of anticancer drug. — *J. of Drug Deliv. Sci. and Technol.*, 2018, **44**, 190.
53. *Lee K.Y., Mooney D. J.* Alginate: properties and biomedical applications. — *Prog. Polym. Sci.*, 2012, **37**, 106.
54. *Desai R.M., Koshy S.T., Hilderbrand S. A., Mooney D.J., Joshi N.S.* Versatile click alginate hydrogels crosslinked via tetrazine-norbornene chemistry. — *Biomaterials*, 2015, **50**, 30.
55. *Boonthekul T., Kong H.J., Mooney D.J.* Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. — *Biomaterials*, 2005, **26**, 2455.
56. *Liu W., Griffith M., Li F.* Alginate microsphere-collagen composite hydrogel for ocular drug delivery and implantation. — *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2008, **19**, 3365.
57. *Болотова Г.В.* Полимерные носители для противотуберкулезных лекарственных средств на основе хитозана. — *Молодой ученый*, 2010, **2(5)**, 208.
58. *Xu J., Strandman S., Zhu J.X., Barralet J., Cerruti M.* Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery. — *Biomaterials*, 2015, **37**, 395.
59. *Bhattacharai N., Gunn J., Zhang M.* Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. — Drug Deliv. Rev.*, 2010, **62**, 83.
60. *Yu H., Lu J., Xiao C.* Preparation and properties of novel hydrogels from oxidized konjac glucomannan cross-linked chitosan for in vitro drug delivery. — *Macromol. Biosci.*, 2007, **7**, 1100.
61. *Das Neves J., Bahia M.* Gels as vaginal drug delivery systems. — *Int. J. Pharm.*, 2006, **318**, 1.

62. *Lozinsky V.I., Kulakova V.K., Ivanov R.V., Petrenko A.Yu., Rogulska O.Yu., Petrenko Yu. A.* Cryostructuring of polymer systems. 47. Preparation of wide porous gelatin-based cryostructurates in sterilizing organic media and assessment of the suitability of thus formed matrices as spongy scaffolds for 3D cell culturing — *E-Polymers*, 2018, **18(2)**, 172.
63. *Rodionov I.A., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Ya., Shabatina T.I., Lozinsky V.I.* Cryostructuring of polymer systems. 44. Freeze-dried and then chemically cross-linked wide porous cryostructurates based on serum albumin — *E-Polymers*, 2017, **17(4)**, 263.
64. *Подорожко Е.А., Ульябаева Г.Р., Тихонов В.Е., Грачев А.В., Владимиров Л.В., Антонов Ю.А., Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И.* Изучение криоструктурирования полимерных систем. 43. Особенности микроструктуры хитозан-содержащих комплексных и композитных криогелей поливинилового спирта — *Коллоидный журнал*, 2016, **78(6)**, 760.
65. *Gough S., Barron N., Zubov A.L., Lozinsky V.I., McHale A.P.* Production of ethanol from molasses at 45 °C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in calcium alginate gels and poly(vinyl alcohol) cryogel — *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1998, **19(2)**, 87.
66. *Верная О.И., Шабатин В.П., Семенов А.М., Шабатина Т.И.* Получение криохимически модифицированного ультрадисперсного порошка диоксида и определение его антибактериальной активности — *Вестн. МГУ Сер. 2. Химия*, 2016, **57(5)**, 315.
67. *Верная О.И., Шабатин В.П., Семенов А.М., Шабатина Т.И.* Криохимический синтез и антибактериальная активность нанокompозитов серебра с диоксидом — *Вестн. МГУ Сер. 2. Химия*, 2017, **57(6)**, 388.
68. *Верная О.И., Шабатин В.П., Шабатина Т.И., Хватов Д.И., Семенов А.М., Юдина Т.П., Данилов В.С.* Криохимическая модификация диоксида, его активность и токсичность — *Журн. физ. химии*, 2017, **91(2)**, 230-233.
69. *Верная О.И., Хватов Д.И., Нурждина А.В., Федоров В.В., Шабатин В.П., Семенов А.М., Шабатина Т.И.* Гибридные нанокompозиты Cu/диоксидин: криохимический синтез и антибактериальная активность — *Вестн. МГУ Сер. 2. Химия*, 2017, **58(5)**, 271.
70. *Верная О.И., Шабатин В.П., Нурждина А.В., Звукова Н.Д., Хватов Д.И., Семенов А.М., Лозинский В.И., Шабатина Т.И., Мельников М.Я.* Криохимический синтез и антибактериальная активность гибридных нанокompозитов диоксида с наночастицами Ag и Cu, включенных в биополимерные криоструктураты — *Известия Академии наук. Сер. Химическая*, 2017, **11**, 2152.
71. *Shabatina T.I., Vernaya O.I., Shabatin V.P., Evseeva I.V., Melnikov M.Ya., Fitch A.N., Chernyshev V.V.* Cryochemically Obtained Nanoforms of Antimicrobial Drug Substance Dioxidine and Their Physico-chemical and Structural Properties — *Crystals* 2018, **8**, 298.
72. *Верная О.И., Епишев В.В., Марков М.А., Нурждина А.В., Федоров В.В., Шабатин В.П., Шабатина Т.И.* Синтез наночастиц меди термическим разложением безводного формиата меди — *Вестн. МГУ Сер. 2. Химия*, 2017, **58(5)**, 269.
73. *Сайкова С.В., Воробьев С.А., Николаева Р.Б., Михлин Ю.Л.* Определение условий образования наночастиц меди при восстановлении ионов Cu<sup>2+</sup> растворами гидрата гидразина — *Журн. общ. Химии*, 2010, **80(6)**, 952.
74. *Онищенко Г.Г.* Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М: Методические указания, 2004, 40 с.



## Глава 6

### Биокатализаторы в криоструктурированных полимерных матрицах

*Ефременко Е.Н.<sup>1,2</sup>, Лягин И.В.<sup>1,2</sup>, Лозинский В.И.<sup>3</sup>*

Разработка новых биокатализаторов различного назначения всегда связана со стремлением исследователей в конечном итоге получить систему с продолжительным функционированием при сохранении максимального уровня эффективности каталитической активности. Действующим началом таких биокатализаторов являются ферменты, клеточные органеллы или целые клетки. Имобилизация в/на различных носителях белков/ферментов, а также целых клеток, как катализаторов разных биохимических процессов, может существенно улучшить их операционные характеристики, что важно в плане применения таких иммобилизованных каталитических систем для решения самых разнообразных практических задач [1–5].

Дополнительно к увеличению длительности проявления препаратами их каталитических и функциональных характеристик иммобилизация предоставляет возможность многократного использования получаемых стабилизированных форм ферментов/клеток в различных биотехнологических процессах, что повышает их экономическую привлекательность. Для иммобилизации ферментов/клеток применяются самые разнообразные методы и различные носители, причем среди последних по своим уникальным операционным возможностям заметно выделяются криогенно-структурированные матрицы. Например, к ним относятся гелевые материалы, получаемые в результате неглубокого замораживания, экспонирования в замороженном состоянии и размораживания растворов или коллоидных дисперсий, содержащих мономерные или полимерные предшественники, способные к образованию гелей. Полимерные материалы, формируемые в таких условиях, называются криогелями и они обладают некоторыми особенностями по сравнению с обычными гелями, получаемыми при температурах выше точки замерзания растворителя [6–11]. После размораживания гелеобразующей системы полученный криогель содержит полости,

<sup>1</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

<sup>2</sup> ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334, ул. Косыгина, д. 4

<sup>3</sup> ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119334, ул. Вавилова, д. 28

заполненные жидкостью от растаявших кристаллов растворителя. Тем самым, поликристаллы растворителя выступают в роли порообразователя при формировании криогеля. В зависимости от свойств и начальной концентрации предшественников, а также условий проведения криогенного процесса можно получать два основных типа криогелей: 1) макропористые матрицы с размером пор от десятых долей до десятков мкм и 2) широкопористые (губчатые) матрицы с порами от десятков до сотен мкм. Использование криогенно-структурированных полимерных матриц, обладающих такой макропористой структурой, позволяет в широких пределах варьировать форму и размер частиц иммобилизованных биокатализаторов, существенно менять их характеристики для направленной адаптации к требованиям конкретного процесса, а применение матриц с широкопористой структурой обеспечивает получение носителей непосредственно в реакторах колоночного типа, которые могут эффективно использоваться в проточных системах для выделения и очистки биомолекул и даже клеток, биодетекции и биокатализа [7, 12-24].

Многие полимерные криогели обладают хорошими эксплуатационными характеристиками, например химической стабильностью, механической прочностью, существенно превышающей аналогичные показатели, известные для других типов носителей. Кроме того, матрица полимерного криогеля может быть легко химически модифицирована различными лигандами, необходимыми для иммобилизации ферментов/клеток, что значительно расширяет возможности применения таких носителей для создания разнообразных новых биокатализаторов и их последующего использования в соответствующих каталитических реакциях. Высокая стабильность определенных полимерных криогенно-структурированных носителей обуславливает возможность их длительного функционирования как в водных средах, так и в средах с органическими растворителями [13, 17, 18, 21, 24-31]. Совокупность всех этих свойств позволяет решать нетривиальные задачи в биотехнологии и медицине с использованием создаваемых биокатализаторов, иммобилизованных в/на таких матрицах.

Основным направлением исследований по данной тематике, уже выполненных и проводимых в настоящее время специалистами разных стран, является разработка новых оригинальных носителей и способов иммобилизации различных ферментов и клеток в/на этих криогенно-структурированных полимерных матрицах. В данной главе обсуждается современный уровень развития подобных иммобилизованных биокаталитических систем, анализируется область их возможного применения и те основные характеристики, которые делают такие системы привлекательными для разработок и применения.

## 6.1. Полимерные криогели и криоструктураты в качестве носителей иммобилизованных молекул и клеток

Как хорошо известно, различные синтетические и природные полимеры, а также материалы на их основе широко применяются в медицине и биотехнологии [32–36]. Зачастую необходимо, чтобы соответствующая полимерная матрица обладала определенной пористостью, в частности макропористостью в сочетании со взаимосвязанностью пор, способной обеспечить незатрудненное проникновение компонентов внешней жидкой среды в объем полимерного материала, причем не только по диффузионному, но, в ряде случаев, и по конвекционному механизму. Именно такой морфологией обладают полимерные криогели и криоструктураты, сформированные на основе как природных, так и синтетических полимеров [6–11].

Первый тип этих материалов, т. е. *криогели*, получается в результате последовательного замораживания, выдерживания в замороженном состоянии в течение необходимого времени и затем оттаивания растворов предшественников, способных к образованию трехмерной полимерной сетки, межмолекулярные узлы которой стабилизируются связями нефлуктационной природы. Иными словами, криогели – это полимерные гелевые матрицы, чье образование происходило в замороженной среде [6, 9, 11, 37, 38]. В свою очередь, полимерные *криоструктураты* получают в отсутствие гелеобразователей, когда раствор полимерного предшественника замораживают и далее удаляют поликристаллы растворителя сублимацией или криоэкстракцией, а остающийся после этого пористый полимерный каркас тем или иным способом переводят в нерастворимое состояние, т. е. дубят [6, 39–45].

Макропористая морфология с системой взаимосвязанных крупных пор является характерным свойством полимерных криогелей и криоструктуратов, во многом определяющим области применения этих материалов, в том числе в качестве носителей иммобилизованных молекул (например, ферментов) или клеток, проявляющих присущую им биокаталитическую активность. В общем случае системы «биологические молекулы — носитель» или «клетки — носитель» называются «*иммобилизованными биокатализаторами*» (ИБК), а их интегральные свойства (каталитическая активность и эксплуатационные характеристики) обусловлены совокупностью свойств всех составляющих системы — и биокаталитического действующего начала, и его носителя [1–5].

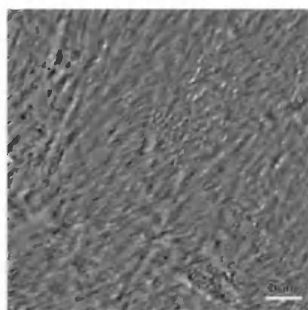
Если сравнивать некий ИБК, включающий каталитически-активный компонент (фермент, органелла, клетка), иммобилизованный на/в каком-то «традиционном» носителе, например обычном микропористом геле,

с ИБК, базирующемся на аналогичных ферментах, органеллах или клетках, но иммобилизованных с использованием макропористых криогелей или криоструктуратов, то выявляемые различия главным образом будут определяться как раз специфической структурой носителя. Например, казеин, в водной среде в основном присутствующий в виде мицеллярных агрегатов массой до 160 кг/моль в динамическом равновесии с небольшой фракцией частиц меньшего размера [46], лишь медленно гидролизует трипсином, ковалентно иммобилизованным в частицах агарозного геля (Sephagrose 4B), т. к. крупные белковые мицеллы не могут диффундировать в поры такого ИБК. Когда же этот фермент иммобилизован в гранулы макропористого криогеля поливинилового спирта (ПВС), то скорость протеолиза резко повышается, поскольку в поры этого ИБК диффундируют все компоненты коллоидного раствора казеина [47, 48]. Таким образом, использование именно макропористого носителя для иммобилизации ферментов позволяет работать с очень крупными субстратами.

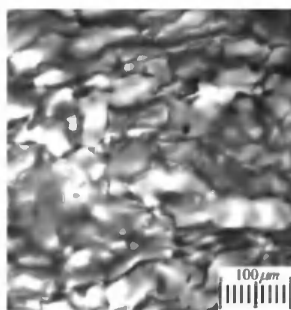
В зависимости от природы и концентрации предшественников, а также условий всех стадий криогенной обработки исходных систем можно получить два основных типа криогенно-структурированных полимерных материалов: макропористые матрицы с размерами пор от десятых долей до десятков мкм и губчатые широкопористые (сверхмакропористые) матрицы, пронизанные системой сообщающихся крупных пор сечением от десятков до сотен мкм [6, 11, 18, 49, 50]. Микрофотографии, сделанные с помощью светового микроскопа (рис. 6.1), демонстрируют примеры пористой морфологии ряда типичных представителей полимерных криогелей (верхний ряд) и криоструктуратов (нижний ряд):

- а) макропористый нековалентный (физический) криогель ПВС, сформированный из водного раствора полимера замораживанием при  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  [51];
- б) широкопористый криогель на основе сшитого поли(N,N-диметилакриламида), синтезированного при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в замороженной водной среде сополимеризацией N,N-диметилакриламида с N,N'-метиленабис-акриламидом [52];
- в) широкопористый криогель на основе хитозана, сшитого глутаровым альдегидом в слабом растворе уксусной кислоты, замороженном при  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  [53];
- г) широкопористый кальций-альгинатный криоструктурат, полученный замораживанием при  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  водного раствора альгината натрия с последующей сублимацией льда и твердофазным ионным сшиванием цепей полимера ионами  $\text{Ca}^{2+}$  в среде нерастворителя полимера [39];

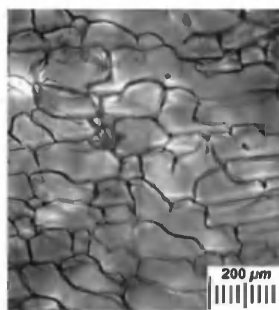
- д) широкопористый полистирольный криоструктурат, сформированный отверждением при  $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$  раствора полимера в расплавленном нафталине ( $T_{\text{пл.}} + 80,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и дальнейшей криоэкстракцией кристаллов растворителя серным эфиром [54];
- е) макропористый криоструктурат, полученный замораживанием при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  водной дисперсии бутадиен-стирольного латекса [55].



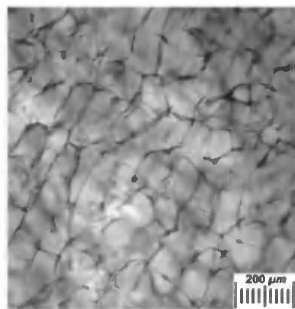
а) Макропористый криогель поливинилового спирта, сформированный замораживанием водного раствора ПВС при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (масштабная линейка – 20 мкм) [51].



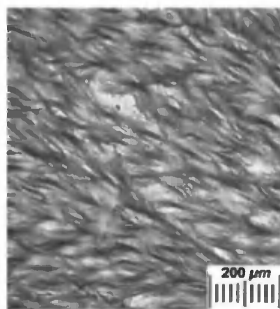
б) Широкопористый криогель, синтезированный сополимеризацией N,N-диметил-акриламида с N,N'-метил-бис-акриламидом в замороженной ( $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) водной среде [52].



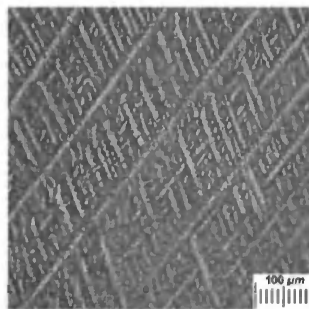
в) Широкопористый криогель на основе хитозана, сшитого глутаровым альдегидом в замороженном ( $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 2%-ном водном растворе уксусной кислоты [53].



z) Широкопористый кальций-альгинатный криоструктурат, сформированный из водного раствора альгината натрия последовательным замораживанием ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), лиофилизацией и сшиванием ионами кальция [39].



д) Широкопористый криоструктурат, сформированный «замораживанием» при  $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$  раствора полистирола в нафталине с последующей криоэкстракцией кристаллической фазы [54].



е) Макропористый криоструктурат, сформированный замораживанием ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) водной дисперсии бутадиен-стирольного латекса [55].

**Рис. 6.1.** Микрофотографии (оптический микроскоп) пористой морфологии образцов полимерных криогелей (а–в) и криоструктуратов (z–e). Репродукции сделаны с разрешения издательства Springer Nature

Темные элементы структуры на этих микрофотографиях — фаза собственно полимерного геля, из которого состоят стенки макропор, светлые области — сами поры, заполненные или жидкой средой (вода — рис. 6.1, а–z), или воздухом (рис. 6.1, д, е). Приведенные примеры и доступные лите-

ратурные данные свидетельствуют о возможности получения различных криогенно-структурированных полимерных матриц не только в водных, но и в органических средах на основе органорастворимых предшественников при использовании кристаллизующихся органических растворителей, а также о возможности формирования криогелей и криоструктуратов на основе коллоидно-дисперсных систем [6, 9, 49, 50, 54].

Внутри таких макропористых матриц, как криогели ПВС (рис. 6.1, *в*), по порам микрометрового сечения могут свободно диффундировать растворимые компоненты любой молекулярной массы [56-59] и даже биологические частицы типа вирусов [60, 61]. А внутри сверхмакропористых криогенно-структурированных полимерных материалов (рис. 6.1, *а*, *б*, *г*) возможен не только диффузионный массоперенос, но и протекание жидкости по системе микрокапилляров, т. е. конвекционный массоперенос растворимых веществ и даже частиц, сопоставимых по размеру с микробными и животными клетками. Именно эти особенности морфологии полимерных криогелей и криоструктуратов делают их привлекательными системами для использования в качестве носителей для иммобилизации биокатализаторов: поскольку имеется тот уровень пористости, который позволяет и молекулам, и биологическим частицам проникать в массу материала и взаимодействовать с его компонентами (например, иммобилизованными лигандами или реакционноспособными группами для ковалентного связывания с носителем) по всему объему полимерной матрицы.

В этой связи, важным моментом является уточнение терминологии, используемой нами в дальнейшем при рассмотрении способов иммобилизации молекул и клеток в/на криогенно-структурированных носителях. Наряду с другими факторами результативность работы того или иного ИБК существенным образом зависит от эффективности подвода субстратов к каталитическим центрам и отвода от них продуктов соответствующих реакций, что определяется микроокружением удерживаемых носителем молекул или клеток, т. е. наличием или отсутствием создаваемых полимерной матрицей диффузионных барьеров. В этом контексте и используются термины «иммобилизация в носителе» и «иммобилизация на носителе».

В первом случае между биокатализатором и внешней средой имеется слой материала носителя, через который происходит диффузионно-контролируемый транспорт веществ. Наиболее наглядными примерами являются ферменты или клетки, иммобилизованные включением в полимерные гели, т. е. «иммобилизованные в носителе», и, конечно, свойства матрицы носителя (в частности, его пористость, заряд, гидрофильность/гидрофобность и др.) сильно влияют на результирующую активность, проявляемую соответствующим ИБК. Во втором случае, т. е. при «иммоби-

зации на носителе», иммобилизованные молекулы или клетки хотя бы частью своей поверхности находятся в непосредственном контакте с внешней средой, т. е. значимых диффузионных барьеров нет. Очевидным примером таких систем могут служить биокатализаторы, закрепленные на поверхности полимерных пленок, мембран или волокон.

Что же касается криогенно-структурированных матриц, то при их использовании возможны оба варианта иммобилизации — и в массе материала, и на нем (к примеру, на поверхности полимерной фазы широкопористых криогелей и криоструктуратов). Эти варианты иллюстрируются на рис. 6.2 электронными микрофотографиями [62] клеток бактерий *E. coli*, включенных в гелевую фазу тонких стенок макропор губчатого полиакриламидного криогеля (рис. 6.2, а), т. е. «иммобилизация в носителе», и ковалентно-пришитых на внутренней поверхности таких стенок (рис. 6.2, б) — «иммобилизация на носителе». Как правило, вариант (а) реализуется иммобилизацией биокаталитического объекта одновременно с формированием носителя, тогда как в случае (б) обычно сначала получают носитель, и лишь затем в его объеме (через систему пор) или на поверхности материала фиксируют биокатализатор путем ковалентного присоединения или адсорбции за счет нековалентных взаимодействий.

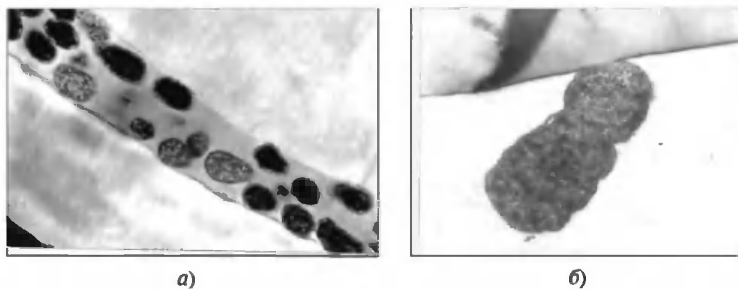


Рис. 6.2. Электронные микрофотографии ультратонких срезов препаратов ИБК с иммобилизованными клетками *E. coli*, включенными в стенки макропор (а) и химически пришитыми на поверхности стенок макропор (б) губчатого полиакриламидного криогеля [62]

Выбор пути иммобилизации и оптимального носителя диктуется конкретной задачей, для решения которой создается соответствующий ИБК. В этой связи важно знать — какие факторы и как влияют на физико-химические и структурные характеристики таких носителей, чтобы целенаправленно адаптировать их свойства к условиям планируемой работы иммобилизованной биокаталитической системы. Основные из этих факторов будут рассмотрены сначала в отношении макропористых, а затем сверхмакропористых (широкопористых) криогенно-структурированных носителей для ИБК.

Среди полимерных матриц, обладающих макропористой структурой, в качестве носителей иммобилизованных молекул и клеток наиболее часто применяются нековалентные криогели на основе поливинилового спирта — ПВС (рис. 6.1, а). Такой выбор обусловлен их химической и биологической стойкостью, хорошими физико-механическими характеристиками, обеспечивающими высокую операционную стабильность этих материалов, а также макропористой морфологией гелевой матрицы, что гарантирует незатрудненный дополнительными диффузионными барьерами массоперенос растворимых веществ. Кроме того, благодаря наличию в структуре ПВС большого числа ОН-групп имеются широкие возможности для химической модификации носителя с целью введения реакционноспособных функций, предназначенных для дальнейшего ковалентного присоединения биокаталитически-активного компонента к матрице криогеля ПВС [6, 7, 12, 17, 24–31, 47, 48, 57, 61, 63–70].

С точки зрения эксплуатационных свойств этих криогелей как носителей для ИБК, существенны физико-механические характеристики полимерной матрицы, ее теплостойкость, устойчивость к абразивному износу частиц в реакторах с перемешиванием и осмотическая стабильность в средах разного состава, т. е. отсутствие эффектов нежелательного сильного разбухания при изменении, например, ионной силы или рН рабочего раствора. Всеми этими показателями криогелей ПВС, включая и параметры их пористости, вполне можно «управлять».

Во-первых, важен правильный выбор самого гелеобразующего полимера — ПВС с нужными характеристиками, т. е. молекулярной массой, количеством остаточных О-ацильных группировок (степенью деацилирования), тактичностью цепей [6, 49, 51, 71–74]. Как правило, для получения высокомолекулярных и теплостойких криогелей ПВС используют марки полимера с малым содержанием неомыленных О-ацильных групп и молекулярной массой выше 70 кг/моль [49, 51, 73].

Во-вторых, свойства гелевой матрицы сильно зависят от концентрации ПВС в исходном растворе — до определенного содержания полимера чем оно выше, тем выше модуль упругости и температура плавления получающегося криогеля, но меньше размер его макропор [51]. Однако после достижения некоторого максимума эффективность криотропного гелеобразования начинает снижаться из-за сильного возрастания вязкости системы [51, 73].

В-третьих, на физико-химические свойства и микроструктуру криогелей ПВС заметное влияние могут оказывать различные растворимые добавки, присутствующие в растворе полимера, подвергаемом криогенной обработке. Например, наличие в исходном водном растворе ПВС добавок низкомолекулярных алифатических (C1–C4) спиртов, а также этиленгли-

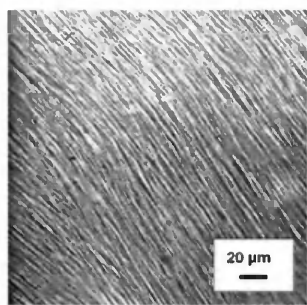
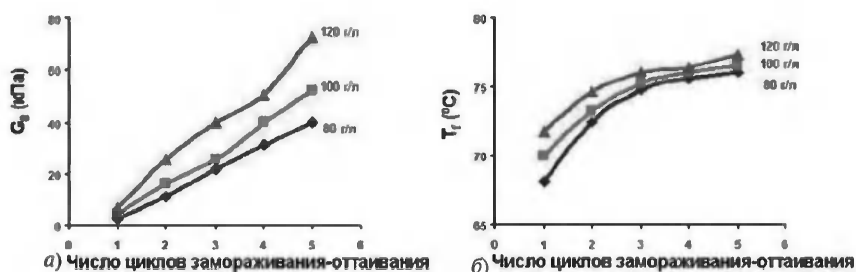


коля или глицерина, проявляющих дегидратирующее действие в отношении полимера, после криогенной обработки таких систем приводит к криогелям, чьи физико-механические характеристики значительно уступают образцам, сформированным в аналогичных условиях, но без спиртовых добавок [74]. В то же время, введение в раствор полимера олигомерных этиленгликолей [75] или сахарозы [76] дает противоположный результат — получаются более жесткие и теплостойкие криогели по сравнению с эквивалентными (по полимеру) препаратами без добавок.

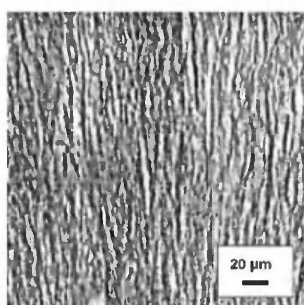
Различные дополнительно вводимые соли также по-разному влияют на криотропное гелеобразование ПВС и на свойства формируемых криогелей. Добавки одних из них, в частности NaF или KCl, способствуют повышению прочностных показателей гелевого материала, а введение в исходный раствор полимера, например LiCl или NaSCN, снижает эффективность гелеобразования [77, 78]. Как правило, вещества, способствующие водородному связыванию (так называемые космотропные агенты [79]), в той или иной степени повышают жесткость и теплостойкость криогелей ПВС [80], а соединения, препятствующие образованию водородных связей (хотропные агенты [79]), снижают те же показатели этих нековалентных криогелей [80].

В-четвертых, существенными факторами для свойств полимерных криогелей и криоструктуратов вообще, и для нековалентных матриц типа криогелей ПВС в частности, являются режимы криогенной обработки растворов предшественников. К основным параметрам таких режимов относятся скорость и глубина замораживания, а также температура и продолжительность инкубации системы в замороженном состоянии. Эти вопросы достаточно полно рассмотрены в главе 3 настоящей книги. Вместе с тем, для физических криогелей, у которых узлы пространственной сетки стабилизированы нековалентными взаимодействиями, например, межмолекулярными водородными связями как в криогелях ПВС [6, 73, 81–84], имеется еще два параметра режима криогенной обработки, оказывающих значительное влияние на свойства и микроструктуру формируемых материалов. Это — скорость нагревания замороженных образцов во время их оттаивания [49, 51, 54, 73, 85–90] и число циклов замораживания-оттаивания [49, 71–73, 82, 91–98]. Чем медленнее размораживаются образцы, тем более жесткими и высокоплавкими получаются криогели. Аналогичным образом действует и многократное «перемораживание», приводящее к повышению модуля упругости криогелей ПВС (рис. 6.3, а), их теплостойкости, т. е. температуры плавления (рис. 6.3, б), а также к заметному, в основном после 2-го цикла криогенного воздействия, увеличению размеров макропор (рис. 6.3, в–д).

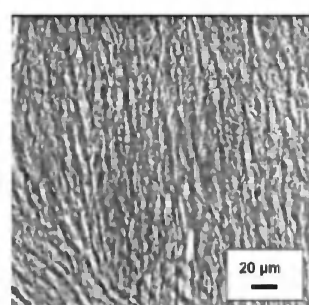
Таким образом, правильно комбинируя указанные выше параметры процесса криоструктурирования ПВС, а также и других полимеров, способных давать макропористые криогели, можно для иммобилизации молекул или клеток в результате получить носители, обладающие именно тем комплексом свойств, который необходим при решении каждой конкретной биотехнологической задачи.



в) (Макро)пористость 50,3%  
Среднее сечение пор: 2,6 мкм  
1 цикл замораживания-оттаивания



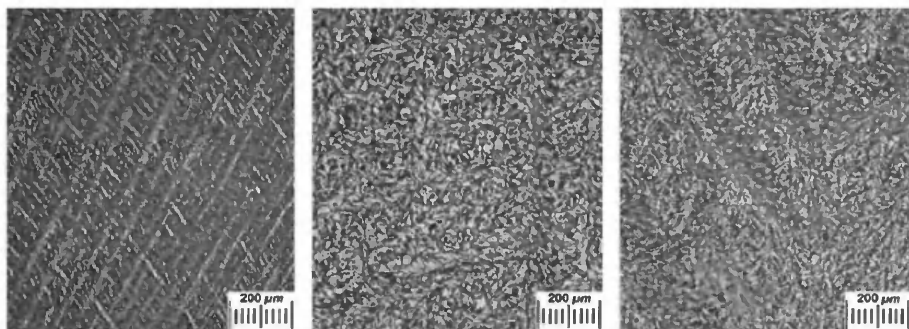
з) (Макро)пористость 80,8%  
Среднее сечение пор: 6,1 мкм  
2 цикла замораживания-оттаивания



д) (Макро)пористость 79,8%  
Среднее сечение пор: 6,5 мкм  
5 циклов замораживания-оттаивания

**Рис. 6.3.** Влияние числа циклов замораживания-оттаивания на значения условного мгновенного сдвигового модуля упругости *а)*, температуру плавления *б)* и макропористую морфологию (*в-д)* криогелей ПВС (концентрация ПВС (69 кг/моль) в исходном растворе — 100 г/л; температура замораживания  $-20^{\circ}\text{C}$ ; инкубация в замороженном состоянии — 18 ч; скорость нагрева при оттаивании —  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) [98]. Репродукции сделаны с разрешения издательства Springer Nature

Существенным для свойств получаемого материала фактором при получении криогенно-структурированных полимерных матриц из коллоидно-дисперсных предшественников является содержание полимера в системе, подвергаемой замораживанию-оттаиванию. В частности, на микрофотографиях (рис. 6.4) приведены примеры влияния исходной концентрации полимера на особенности макропористой морфологии криоструктуратов, сформированных замораживанием-оттаиванием водных дисперсий бутадиен-стирольного латекса [55].



а) Концентрация латекса – 7,5% б) Концентрация латекса – 10,0% в) Концентрация латекса – 12,5%

**Рис. 6.4.** Микрофотографии (оптический микроскоп) криоструктуратов, сформированных из водных дисперсий, содержащих 7,5 (а), 10,0 (б) и 12,5% (в) бутадиен-стирольного латекса (замораживание при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 12 ч, нагревание со скоростью  $0,03\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  при оттаивании образцов) [55]. Репродукции сделаны с разрешения издательства Springer Nature

Поскольку поликристаллы льда в таких процессах выполняют роль порообразователей, то довольно регулярное чередование темных (полимерная фаза) и светлых (заполненные водой макропоры) участков изображения, напоминающего текстиль, образца на рис. 6.4, а, скорее всего свидетельствует о близком к равномерному распределению зародышей кристаллов льда (гомогенная нуклеация) в объеме образца при замерзании такой дисперсной системы. Повышение концентрации латекса приводит к изменению морфологии криоструктуратов (рис. 6.4, б, в): расположение структурных элементов становится не столь регулярным, увеличиваются диаметр макропор и толщина тяжелей полимерной фазы. Последний эффект, по-видимому, объясняется тем, что при более высокой концентрации латексных частиц в исходной суспензии большее их количество включается в массу непрерывной полимерной фазы, образующейся в пространствах между поликристаллами льда. Самой же агрегации частиц при неглубоком замораживании дисперсий бутадиен-стирольного латекса, как и других криочувствительных латексов, способствуют процессы механического сближения частиц растущими кристаллами льда, нарушения целостности защитного слоя вокруг каждой частицы и, как результат, усиления, между ними гидрофобных взаимодействий [99].

Когда речь идет о нацеленном регулировании свойств и текстуры более крупнопористых полимерных криогелей и криоструктуратов, имеющих губчатую морфологию, то основными «рычагами управления», как правило, служат температурные режимы замораживания и выдерживания системы в замороженном состоянии. В качестве примера можно привести

широкопористые криогели на основе агарозы — неионного полисахарида из агар-агара.

Получение используемых для иммобилизации животных [100–103] и микробных [104] клеток криогенно-структурированных агарозных губчатых носителей — непростая задача, так как горячие водные растворы этого полимера при охлаждении всего до 40–30 °С быстро претерпевают золь-гель переход, т. е. еще до того, как системе удастся заморозить. Поэтому для протекания гелеобразования именно в замороженной среде необходимо замедлить «саможелирование» раствора агарозы при положительных температурах, чтобы в результате кристаллизации растворителя проявились эффекты криоконцентрирования, а формирование трехмерной полимерной сетки имело бы место в объеме незамерзшей жидкой микрофазы. Подобного замедления гелеобразования можно достичь наведением одноименных зарядов вдоль по цепи либо протонированием ОН-групп полимера в кислой среде, либо их депротонированием в щелочной среде [102, 105]. Последний вариант, как оказалось, более предпочтителен для криоструктурирования растворов агарозы, что по завершении процесса дает криогели с ажурной широкопористой морфологией (рис. 6.5), параметры которой в основном определяются температурой замораживания.

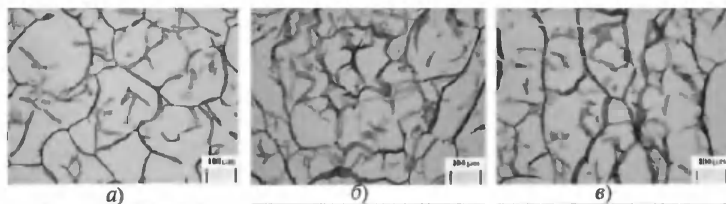


Рис. 6.5. Микрофотографии (оптический микроскоп) тонких срезов агарозных криогелей, сформированных при  $-10$  (а),  $-20$  (б) и  $-30$  °С (в) (окрашивание крезильовым фиолетовым) [102]. Репродукции сделаны с разрешения издательства John Wiley and Sons

Чем эта температура замораживания ниже, тем мельче поликристаллы замораживаемого растворителя и, как следствие, меньше сечение пор в полученном полимерном материале.

## 6.2. Иммуобилизация ферментных биокатализаторов на криогенно-структурированных носителях

Уже классическими стали методы ковалентной и «физической» иммуобилизации различных ферментов. Криоструктурированные носители обеспечивают широкие возможности как для выбора объекта и способа его иммуобилизации, так и для вариантов дальнейшего использования получаемых ИБК. Далее речь пойдет о том, какие преимущества получают создаваемые биокаталитические системы от применения подобных носителей при использовании того или иного способа иммуобилизации.

Наиболее привлекательной представляется сегодня иммуобилизация белков за счет ионного и аффинного взаимодействия. Хотя и тот, и другой вариант химического взаимодействия фермента с носителем широко применяется для выделения и очистки белков, и известно немало работ, в которых за счет ионного и аффинного взаимодействия с носителем создаются иммуобилизованные ферментные биокатализаторы. Особый интерес представляет иммуобилизация ферментов за счет аффинных взаимодействий, которая получила достаточно интенсивное развитие ввиду наличия ряда ключевых преимуществ:

- 1) высокая специфичность и селективность связывания, с одной стороны, позволяет осуществлять иммуобилизацию фермента без его предварительной очистки и при этом гарантированно иммуобилизовать именно целевой фермент. С другой стороны, это повышает эффективность иммуобилизации и снижает требования к избыточно высокой емкости носителя;
- 2) достаточно высокая прочность связывания фермента с носителем. Это положительно сказывается на стабильности таких биокатализаторов при хранении и использовании. Кроме того, это позволяет в контролируемых условиях проводить регенерацию биокатализатора путем удаления инактивированного фермента и нанесения нового активного препарата.

К настоящему времени разработано большое количество различных вариантов биокатализаторов на основе аффинного связывания ферментов. Однако далее будут рассмотрены лишь несколько основных групп, иллюстрирующих возможности данного метода: иммуобилизация за счет взаимодействия антиген-антитело, за счет аффинности к лектину, а также за счет металл-хелатирующего взаимодействия между аминокислотным остатком (или остатками) белка и ионом металла, прочно связанным с носителем.

## Ковалентная иммобилизация ферментов на криогенно-структурированных носителях

Иммобилизация посредством прочного ковалентного присоединения ферментов к носителю является достаточно давно и активно используемым, а также довольно полно охарактеризованным способом получения стабилизированных форм ферментов широкого спектра применения. Простота данного метода заключается в том, что стадия получения и активации носителя, а также процедура самой иммобилизации могут быть разделены в пространстве и времени. С одной стороны, это снимает ограничения на способ получения самого носителя, позволяя использовать реагенты или условия, способные приводить к полной или частичной инактивации иммобилизуемых ферментов. Это существенно и в случае использования криоструктурированных полимерных матриц в качестве носителей, поскольку их получают при отрицательных температурах, а известно, что многие ферменты существенно инактивируются при замораживании [106], в том числе и при ковалентной иммобилизации [107]. С другой стороны, обсуждаемый способ иммобилизации позволяет оптимизировать большее количество параметров проведения процесса, что положительно сказывается на его результирующей эффективности действия.

При разработке биокаталитических систем в качестве объектов, ковалентно иммобилизуемых на криогелевых носителях, был апробирован довольно широкий круг ферментов, относящихся к самым разным классам (табл. 6.1). Выбор того или иного фермента в этих исследованиях определялся прикладным назначением создаваемого иммобилизованного биокатализатора, его каталитическими функциями.

Ковалентная иммобилизация, например, в криогели ПВС позволяет использовать получаемые биокатализаторы в довольно «жестких» условиях. В частности, таковыми для ферментов являются реакционные среды с различными органическими растворителями [31, 68, 108, 109] и ингибиторами [116], а также повышенные температуры [112], вызывающие инактивацию растворимых форм этих же ферментов. При этом имеется круг биосинтетических задач, требующих применения подобных условий для ферментативных биокатализаторов на практике, в частности, при их использовании в реакциях тонкого органического синтеза [31, 68, 108, 109] или в присутствии противомикробных агентов в условиях повышенных температур [112, 115].

Существенное значение для получения высокоактивного иммобилизованного ферментного биокатализатора имеет природа активирующего агента, используемого для введения реакционноспособных групп в матрицу

носителя. Универсальных решений тут нет, но за счет подбора или оптимизации химической природы этого активирующего агента, его количества, вводимого в полимерный носитель, а также условий проведения активации и иммобилизации фермента можно значительно улучшить эффективность получения и активность готового биокатализатора. В качестве таких сшивающих агентов могут выступать самые разнообразные соединения: диальдегиды (глутаровый альдегид, терефталевый диальдегид, диальдегид янтарной кислоты и т. д.) [31], сиреневый альдегид [107], полиглутаровый альдегид [115], дивинилсульфон [31], эпихлоргидрин [68], аллилглицидиловый эфир [112–113, 114] и т. д. Дополнительно между активирующим агентом и ферментом может вводиться спейсер, чтобы увеличить подвижность молекулы иммобилизованного белка, хотя из практики известны и отрицательные результаты от введения подобного спейсера [69].

**Таблица 6.1.** Некоторые примеры ковалентной иммобилизации ферментов на криоструктурированных носителях

Фермент [ссылка]	Полимер*	Сшивающий агент	Предназначение биокатализатора
Трипсин [31]	ПВС	Глутаровый альдегид, дивинилсульфон, терефталевый диальдегид, диальдегид янтарной кислоты	Синтез или гидролиз пептидов
Термолизин [68]	ПВС	Глутаровый альдегид, эпихлоргидрин	Синтез пептидов
$\alpha$ -Химотрипсин, субтилизин [108–109]	ПВС	Глутаровый альдегид	Синтез пептидов
Глюкозоксидаза/пероксидаза хрена, савиназа/эспераза [110]	Смесь альбумина и хитозана	Глутаровый альдегид	Определение глюкозы, гидролиз белков
Глюкозоксидаза [111]	ПВС, покрытый МУНТ	Глутаровый альдегид	Определение глюкозы
Амилоглюкозидаза [112]	со-ПММА-ГМА	Глицидил (из АГЭ)	Гидролиз крахмала
$\alpha$ -Амилаза [113]	со-ПАА-АГЭ	Глицидил (из АГЭ)	Гидролиз крахмала
Лакказа [69–70]	ПВС	Глутаровый альдегид	Окисление ароматических соединений
Лакказа [114]	со-ПГЭМА-ГМА	Глицидил (из АГЭ)	Окисление ароматических соединений
Лакказа [107]	со-ПЭГМА-ТЭГДА	Сирингальдегид и АБТС	Окисление ароматических соединений
Инвертаза [115]	со-ПАА-БАА	Полиглутаровый альдегид	Гидролиз сахарозы

\*ПВС — поливиниловый спирт, МУНТ — мультистенные углеродные нанотрубки, со-ПММА-ГМА — сополимер полиметилметакрилата и глицидилметакрилата, со-ПАА-АГЭ — сополимер полиакриламида и аллилглицидилового эфира, со-ПГЭМА-ГМА — сополимер поли-2-гидроксиэтилметакрилата и глицидилметакрилата, АГЭ — аллилглицидиловый эфир, со-ПЭГМА-ТЭГДА — сополимер поли(этиленгликоль) метакрилата и тетраэтиленгликоль диакрилата, АБТС — 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота), со-ПАА-БАА — сополимер полиакриламида и N, N'-бисакриламида.

Здесь нужно отметить, что существует такое понятие, как «целесообразная» нагрузка создаваемого ИБК по белку, превышение которой приводит к неэффективному функционированию иммобилизуемого фермента. Она была продемонстрирована для трипсина [31],  $\alpha$ -химотрипсина и субтилизина [68] и т. д., а также зависит от множества параметров: химической природы фермента и носителя, используемого метода иммобилизации и др.

Следующим важным фактором для увеличения эффективности биокатализатора представляется оптимизация условий его использования в биокаталитическом процессе: pH среды, температура, концентрация компонентов, длительность реакции, присутствие органических растворителей и т. д. Увеличение эффективности при получении, а также стабильности при хранении и использовании ферментных ИБК может достигаться за счет введения дополнительных стабилизаторов или применения различных технических приемов. Так, предварительное формирование фермент-полиэлектrolитного комплекса перед процедурой ковалентной иммобилизации показало высокую эффективность применительно к органофосфат-гидролазе в комплексе с полибренном (1,5-диметил-1,5-диазаундекаметилен полиметобромид), к лизоциму в комплексе с полиэтиленимином и т. д. [24]. Для целей «защиты» фермента от инактивации при ковалентной иммобилизации может применяться и субстрат, который, как в случае с лакказой и 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин)-6-сульфоновою кислотой [107], очевидно, связываясь с активным центром фермента, предотвращает его химическую модификацию сшивающим агентом.

Разные ферменты могут быть со-иммобилизованы одновременно в одном и том же биокатализаторе [110]. Такой подход особенно интересен при разработке биосенсорных систем [110, 117], сложных биокаталитических процессов [24, 110] и др., когда требуется сопряжение нескольких биохимических реакций или рециклинг коферментов, кофакторов, ко-субстратов и т. д. для основной ферментативной реакции. Криогенно-структурированные носители предоставляют полную свободу подобных манипуляций благодаря своему строению.

Другая возможность, предоставляемая криогелями и криоструктурами как носителями для получения ИБК, заключается в том, что в ка-



честве субстратов и/или продуктов биокаталитических процессов могут выступать высокомолекулярные соединения (например, белки [110], полисахариды [112–113] и т. д.). Более того, такие ферментные субстраты могут встречаться в реальных средах со сложным матриксом [70, 118].

Интересным является использование композитных криогелевых матриц, в частности, содержащих нанотрубки или покрытых ими на стадии получения криоструктурированных носителей, для иммобилизации ферментов [111]. В результате такие носители могут рассматриваться как альтернатива углеродной пасте, широко применяемой в настоящее время при создании ферментных биосенсоров, благодаря возможному увеличению чувствительности (по сравнению с другими микропористыми носителями и мезопористым углеродом) наряду с расширенным линейным диапазоном определений.

Резюмируя, можно отметить, что ковалентная иммобилизация является наиболее приемлемой для получения ИБК, устойчивых к воздействию различных инактивирующих факторов (температуры, pH, присутствию органических растворителей и пр.), а также обладающих высокой стабильностью при хранении и использовании. Для модификации поверхности криогенно-структурированных носителей наибольшая эффективность обычно наблюдается в случае использования глутарового альдегида. Также позитивным является введение дополнительных стабилизирующих агентов, например, других полимеров, образующих фермент-полиэлектролитные комплексы с иммобилизуемым ферментом, что положительно сказывается на самых разных характеристиках получаемого биокатализатора, и в первую очередь на каталитических.

### **Иммобилизация путем включения фермента в матрицу криогенно-структурированных носителей**

Вторым по значимости, но не по распространенности использования методом иммобилизации ферментов в криоструктурированные носители является иммобилизация ферментов включением в гелевую матрицу. Включение фермента в матрицу носителя может достигаться различными способами (табл. 6.2).

Как и в случае ковалентной иммобилизации, ряд факторов могут оказывать значительное влияние на результирующую эффективность включения и активность получаемого ИБК [24]:

- 1) Баланс гидрофильного и гидрофобного мономера или полимера, используемого при криоструктурировании;
- 2) добавки дополнительных компонентов (белков, полисахаридов, синтетических полимеров и т. д.), выступающих в роли стабилизаторов

- основного фермента или влияющих на его микроокружение или облегчающих диффузию субстратов/продуктов;
- 3) предварительная химическая модификация иммобилизуемого фермента или их комплекса (например, пэгилированием), химическая природа такого модификатора и его количество;
  - 4) концентрация полимера и иммобилизуемого фермента.

**Таблица 6.2.** Некоторые примеры иммобилизации путем включения фермента в матрицу криоструктурированных носителей

Фермент [ссылка]	Полимер	Способ иммобилизации	Назначение биокатализатора
Уреаза [119]	Поли(N-изопропилакриламид)	Ад(б)сорбция или сшивка с помощью ПЭГДА	Гидролиз мочевины
Уреаза [120]	со-ПГЭМА-ПЭГДА, покрытый ПЭГ	Абсорбция слоем ПЭГ	Определение тяжелых металлов, гидролиз мочевины
Липаза [121]	ПГЭМА, покрытый со-ПГМА-МАТ	Абсорбция слоем со-ПГМА-МАТ	Хроматографическое разделение белков
Кератиназа [122]	Композит ПВС и пектина	Включение в криогель в процессе многократного замораживания-оттаивания	Контролируемое введение антибиотиков
Протеаза [123]	ПВС	Включение в криогель	Гидролиз белков
Пероксигеназа (чистая или в смеси с глюкозооксидазой) [124]	Смесь ПВС и ПЭГ	Включение в криогель	Окисление ароматических соединений и углеводов

\* ПЭГДА – полиэтиленгликоль диакрилат, со-ПГЭМА-ПЭГДА – сополимер поли-2-гидроксиэтилметакрилата и полиэтиленгликоль диакрилата, ПВС – поливинилловый спирт, ПЭГ – полиэтиленгликоль, со-ПГМА-МАТ – сополимер полиглицидилметакрилата и N-метакрилоил-L-триптофана.

Такой метод иммобилизации наименьшим образом инактивирует иммобилизуемый фермент в сравнении с ковалентным методом. В то же время, в отличие от ковалентной иммобилизации ад(б)сорбция и/или включение фермента в матрицу носителя происходит за счет множественных слабых взаимодействий (сил Ван-дер-Ваальса, водородных связей). Поэтому в определенных условиях (изменение pH среды, температуры, ионной силы и т. д., введение органических растворителей) возможно усиление вымывания иммобилизованного фермента [24, 119, 123–124] из носителя. Это сильно сужает возможные области применения таких ИБК.

Чтобы исключить или хотя бы значительно снизить подобные негативные процессы, применяются различные подходы. Например, развитая внутренняя поверхность криогенно-структурированного носителя может быть дополнительно покрыта слоем другого полимера [120, 124], гидрофобизована [121] и т. д.

С другой стороны, возможность высвобождения фермента из крио-структурированных матриц создает предпосылки для их использования в создании систем с контролируемым высвобождением ферментов или лекарственных препаратов, со-иммобилизованных с ними [122].

### **Имобилизация ферментов за счет ионного связывания**

Имобилизация белков за счет ионного связывания применяется довольно длительное время в лабораторной практике и прежде всего для аналитической и препаративной хроматографии [125]. В свою очередь, положительные качества, присущие криоструктурированным полимерным матрицам, могут эффективно использоваться для ферментных ИБК, при этом для получения таких препаратов могут применяться разные подходы: формирование композитных носителей, содержащих частицы ионообменных смол [126]; модификация поверхности уже сформированного полимерного криогеля путем его покрытия другим полимером [126–127] или наночастицами [128]; графт-полимеризация [129] и т. д. Наилучшие результаты достигаются с использованием сильных анионитов, например, содержащих сульфогруппы.

Тем не менее иммобилизация ферментов за счет ионных взаимодействий в криогенно-структурированных носителях нашла весьма ограниченное применение для создания ферментных ИБК. Этому есть несколько объективных причин. Во-первых, данный метод не является селективным, и иммобилизованный фермент может содержать различные белковые примеси, которые могут как улучшать, так и ухудшать каталитические свойства ИБК. Во-вторых, зачастую за кадром остается вопрос стабильности таких препаратов при хранении и использовании. Ионное взаимодействие может нарушаться или изменяться под действием внешних условий или веществ, присутствующих или появляющихся в реакционной среде. В результате может происходить заметное вымывание иммобилизованного фермента из носителя и снижение эффективности каталитического действия ИБК.

## Иммобилизация за счет взаимодействия антиген-антитело

Модификация носителя антигеном повсеместно используется в иммуноферментном анализе и наиболее полно изучена в отношении иммобилизации белков (антител). Одним из самых простых в использовании и в то же время обладающих максимально широкой специфичностью по отношению к различным иммуноглобулинам является белок А, что позволяет широко применять его для очистки антител [130]. Прочность связывания его с антителом оказывается таковой, что может удерживать даже клетки В-лимфоцита, вырабатывающую антитела или содержащую наночастицы на поверхности этих клеток [131].

Часто белок А связывают с криогенно-структурированным носителем, используя ковалентную иммобилизацию, что, с одной стороны, позволяет прочно закрепить белок на матрице, а с другой — имеет ограниченное негативное влияние носителя на антигенную активность белка А. Модифицированные таким образом криогели могут использоваться для иммобилизации IgG [132], IgM [133] и др. непосредственно из плазмы крови.

Введение в носитель антител или их фрагментов (например, F(c) цепь IgG) вместо белка А позволяет повысить эффективность связывания вторичных антител (анти-IgG) за счет направленной иммобилизации [134].

Конъюгация антител с целевыми ферментами гарантирует получение супер-эффективных ИБК. Однако широкого применения на практике для биокаталитических целей данный метод пока не получил. Можно прогнозировать, что вскоре определенный интерес могут начать составлять системы, полученные на основе синтетических аптамеров (в качестве модификаторов криогелей) и/или импринтированных криоструктурированных полимеров. Несмотря на большое число работ, применяющих такие криоструктурированные носители сегодня для очистки белков [135-137], пока что в литературе отсутствуют сведения о создании ИБК на их основе.

## Иммобилизация за счет аффинности к гликозидам

В отличие от систем, базирующихся на взаимодействии антиген-антитело и ограниченных в своем применении, широкий круг легкодоступных лектинов может быть использован для иммобилизации ферментов при решении самых разных задач. Высокое сродство к углеводам, прочность связывания и специфичность взаимодействия — основные характеристики, которыми обладают белки-лектины.

Одним из представителей лектинов является конканавалин А, который, в свою очередь, может быть выделен с использованием соответствующей

щих гликозилированных носителей [138] и на основе которого разработаны разнообразные биокаталитические системы. В простейшем случае на носитель, модифицированный конканавалином А, могут быть иммобилизованы гликозилированные ферменты. Специфичность и эффективность такой иммобилизации достаточна даже для очистки целевых белков из сложных матриц [139].

Конканавалин А также может связываться и с негликозилированными белками. Так, была проведена высокоэффективная иммобилизация ипвертазы [140] и инулиназы [141] на криогеле полиэтиленгликольдиметакрилата, модифицированном конканавалином А. Это позволило на порядок увеличить емкость носителя по целевому ферменту и использовать полученный ИБК для эффективного гидролитического «разжижения» сиропов, которые образуются такими субстратами, как сахароза и инулин, присутствующими в водных средах в высоких концентрациях. Здесь нужно отметить, что высоким сродством к гликозидам обладают и некоторые другие лиганды, например 3-аминофенилборная кислота [142], которая широко применяется для создания импринтированных носителей, поэтому теоретически возможно объединение двух этих функциональных способностей в одном и том же криоструктурированном носителе для создания ИБК.

### Иммобилизация за счет металл-хелатирующих взаимодействий

Еще одним вариантом аффинных взаимодействий является металл-хелатирующее связывание, которое происходит при комплексообразовании ионов металлов, прочно удерживаемых носителем, с различными лигандами, присутствующими в структуре иммобилизуемого фермента. Наиболее широкое применение такой подход нашел в лабораторной практике для выделения различных белков, например за счет комплексообразования между ионом металла, удерживаемым носителем, и полигистидиновой последовательностью, генетически вводимой в молекулу фермента или аптитела [24].

Полигистидиновая последовательность, генетически введенная на N- или C-конец молекулы органофосфатгидролазы, позволила провести одновременную очистку и иммобилизацию данного фермента на криоструктурированном сополимере полиакриламида и аллилглицидилового эфира, модифицированном иминодиуксусной кислотой и заряженном ионами Cu(II) или Co(II) [143]. Полученный биокатализатор отличался улучшенной стабильностью и показал высокую эффективность при гидролизе нейротоксичных фосфорорганических соединений в проточной системе.

Помимо указанной выше иминодиуксусной кислоты для модификации криоструктурированных носителей могут применяться, например: полиэтиленимин [144], поли-L-гистидин [145], основание Шиффа с неизвестной структурой (получено на основе ацетилацетона, 3-аминобензойной кислоты, O-карбоксиметилхитозана и монохлоруксусной кислоты) [146], циба-краситель синий 3G-A [147]; или нано- и микрочастицы: частицы бентонита [148], частицы диатомита [149], полимерные микрочастицы, модифицированные иминодиуксусной кислотой [150] и т. д. В качестве хелатирующего иона металла могут быть использованы Ni(II), Cu(II) или Co(II), а также Fe(III) [147, 151] или Zn(II) [152].

Менее специфично металл-хелатирующее связывание происходит в отсутствие специальной генетической модификации иммобилизуемого фермента. Такое взаимодействие возможно благодаря наличию в структуре нативного белка аминокислотных остатков гистидина, цистеина, лизина и аргинина или их кластеров [153].

Как уже обсуждалось ранее, на криогенно-структурированных носителях могут быть иммобилизованы самые разнообразные ферменты с абсолютно разной целью: лакказы для окисления ароматических соединений [52], уреазы для гидролиза мочевины [154], каталазы для разложения перекиси [147], алкогольдегидрогеназы для окисления спиртов [152] и т. д. Так или иначе, большинство таких ИБК предназначено для использования в проточных системах.

Одним из любопытных последствий прочного селективного связывания фермента с металл-хелатирующими носителями является возможность дальнейшего осуществления различных манипуляций непосредственно с иммобилизованным белком. Например, металл-хелатирующая иммобилизация используется для рефолдинга белков и, в частности, это успешно было предпринято в отношении гексагистидин-содержащей органотрифосфатгидролазы с применением криоструктурированного носителя [24].

Можно отметить, что именно металл-хелатирующее связывание белков с криогелями обеспечивает наиболее широкие возможности для создания ИБК, поскольку гарантирует прочность связывания белков с носителем, сравнимую с ковалентной иммобилизацией, и простоту получения ИБК, которая наблюдается при иммобилизации ферментов включением в криоструктурированные матрицы. При этом отсутствует инактивация ферментов, которая обычно происходит при ковалентной иммобилизации, а также отсутствует вымывание фермента из носителя, существующее в случае иммобилизации включением. Одновременно с этим модификация носителя достигается простыми химическими способами с использованием легкодоступных и дешевых реагентов. Однако для увеличения эффективности иммобилизации при таком подходе рекомендуется генетическая модифи-

кация исходного белка и введение в его структуру необходимой аффинной последовательности.

### **Иммобилизация за счет взаимодействий с красителями**

В последнее время появляется все больше работ, предполагающих использование в качестве аффинных лигандов различных красителей. Преимущественно такие модифицированные криоструктурированные носители предназначены для очистки целевых ферментов. Однако, как уже отмечалось в описанных выше случаях ионного связывания и металл-хелатирующей иммобилизации, те же самые носители могут эффективно применяться и для получения ИБК.

В качестве аффинных лигандов предложены такие красители, как реактивный зеленый 19 [155], цибакроновый синий 3G-A [156], щелочной синий 6B [157] и др. Успешная иммобилизация подобным способом была продемонстрирована для лизоцима [158], папаина [155], алкогольдегидрогеназы [156] и др. На примере лизоцима была показана разная емкость криоструктурированных носителей, модифицированных разными лигандами, с небольшим преимуществом щелочного синего 6B [157].

Известно, что различные красители могут специфично связываться с ферментами, что, например, используется в широко применяемом методе определения концентрации белка по Брэдфорд (с красителем кумасси бриллиантовым синим). Пока что не вполне ясно, насколько специфично такое связывание происходит с целевым ферментом, но можно ожидать, что оно не должно быть сравнимым со взаимодействием антиген-антитело или металл-хелатирующим связыванием. Тем не менее это может стимулировать разработку новых или модификацию уже известных лигандов для увеличения их специфичности взаимодействия с целевыми ферментами.

### **6.3. Биокатализаторы на основе разных клеток микроорганизмов, включенных в криогенно-структурированные носители: бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы, искусственные и природные ассоциации разных клеток (анаэробный ил)**

Многие биотехнологические процессы, реализуемые сегодня при использовании гетерогенных биокатализаторов (ГБК) в виде клеток микроорганизмов, иммобилизованных различными методами на разнообразных носителях, позволяют получать целевые продукты как результат сложных

многостадийных биохимических превращений исходных субстратов. Имобилизация клеток, как отмечалось выше, давно обсуждается как эффективный подход к решению задач по интенсификации и повышению экономической привлекательности существующих биотехнологических процессов, основанных на применении различных микроорганизмов, а также как подход к разработке новых биокаталитических систем. Именно при использовании ГБК на основе иммобилизованных клеток возникает возможность создания эффективных биотехнологических процессов, которые характеризуются тем, что ГБК в них используются в течение длительного времени с высоким выходом целевых продуктов, при этом техническое решение таких процессов может быть существенно упрощено по сравнению с процессами на основе биокатализаторов, представляющих собой свободные (суспензионные) клетки [3, 15, 17, 21].

Объективность наличия этих причин подтверждается тем научным и практическим интересом, который существует и не уменьшается в течение уже нескольких десятилетий по отношению к ГБК на основе иммобилизованных клеток. И если раньше этот интерес был преимущественно сосредоточен на клетках бактерий и дрожжей, то в последнее десятилетие наблюдается значительный рост числа разработок, в которых наряду с прежними объектами исследований активно используются новые — клетки мицелиальных грибов, микроводоросли, различные животные клетки (табл. 6.3, [45, 159–193]). При этом интерес к иммобилизованным ГБК обусловлен не только сменой изучаемых биообъектов и необходимостью развития новых процессов, но также новыми возможностями в создании современных носителей для клеток с разнообразными характеристиками, и по-прежнему существующим недостатком фундаментальных знаний о биокаталитических системах, основанных на применении иммобилизованных клеток, и кинетических закономерностях, лежащих в основе их функционирования, в том числе в течение длительного времени.

**Таблица 6.3.** Примеры биокатализаторов, разработанных на основе различных биообъектов, иммобилизованных с использованием криогенно-структурированных носителей

Биообъект; криогенно-структурированный носитель; способ иммобилизации; [ссылка]	Цель применения	Комментарии к биокаталитическим свойствам иммобилизованных биообъектов
<i>Rhizopus oryzae</i> F-814; криогель ПВС, включение в гель [159]	Снижение ХПК сточных вод пищевой промышленности за счет секреции комплекса гидролитических ферментов и потребления продуктов гидролиза в качестве субстратов	Снижение исходного уровня ХПК на 68–79% за 1 рабочий цикл (48–50 ч). Общая длительность функционирования – 600 ч



Таблица 6.3 (продолжение)

Биообъект; криогенно-структурированный носитель; способ иммобилизации; [ссылка]	Цель применения	Комментарии к биокаталитическим свойствам иммобилизованных биообъектов
Активный аэробный или с консорциумом культур, деградирующих фенантрен; криогель ПВС, включение в гель [160]	Окислительная биodeградация полициклических ароматических углеводов	Разложение 250 мг/л фенантрена на 100% в течение 7 суток. Общая длительность функционирования — 9 рабочих циклов
<i>Candida guilliermondii</i> ; криогель ПВС, включение в гель [161]	Конверсия ксилозы в ксилит	Максимальная накапливаемая концентрация ксилита — 28,7 г/л, выход продукта — 49%
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792; криогель ПВС, активированный полиэтиленгликолем, включение в гель [162]	Ацетон-этанол-бутанольная ферментация глюкозы	Максимальная концентрация накапливаемого бутанола 272 г/л и выход бутанола — 41%
<i>Clostridium acetobutylicum</i> В-1787; криогель ПВС, включение в гель [163]	Получение органических растворителей (ацетона, этанола, бутанола) при ферментации гидролизатов биомассы разных микроводорослей	Максимальная концентрация бутанола — 13,2 г/л, выход продукта — 85,7%
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824; агарозо-альгинатный криогель, включение в гель [164]	Ацетон-этанол-бутанольная ферментация глюкозы	Общая концентрация накапливающихся органических растворителей — 27,8 г/л, выход бутанола — 26%
<i>Pimelobacter simplex</i> VKPM Ас-1632; криогель ПВС, включение в гель [165]	1,2-дегидрирование гидрокортизона в преднизолон	Продолжительность использования — 32 рабочих цикла по 45 мин. Средний выход продукта по всем циклам — 94,5%
<i>Pseudomonas putida</i> А300; криогель ПВС, полученный в результате многократного (от 3 до 5 раз) повторения процедуры замораживания-оттаивания матрицы с клетками, включение в гель [166]	Удаление фенола из модельных сточных вод	Разложение на 100% фенола в концентрации 150 г/м <sup>3</sup> за 2-3 ч

Таблица 6.3 (продолжение)

Биообъект; криогенно-структурированный носитель; способ иммобилизации; [ссылка]	Цель применения	Комментарии к биокаталитическим свойствам иммобилизованных биообъектов
<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Rhodococcus ruber</i> ; криогель ПВС, включение в гель [167]	Биодеградация углеводов нефти	Сохранение биокаталитических характеристик в течение 14 месяцев в почве, загрязненной нефтью
<i>Gordonia terrae</i> IEGM 136; криогель ПВС, включение в гель [168]	Стереоселективное окисление фенилметилового сульфида (тиоанизола) до сульфоксида и сульфона	Окисление 0,5 г/л тиоанизола в течение 6 суток с образованием (R)-сульфоксидов (до 93%)
<i>Pseudomonas putida</i> , криогель ПВС, полученный в результате многократного повторения процедуры замораживания-оттаивания матрицы с клетками, включение в гель [170]	Биодеградация изомеров <i>o</i> -, <i>p</i> - и <i>m</i> -крезола	Биотрансформация изомеров крезола в концентрации 150–200 мг/л в течение 1 ч на 60–90%
Анаммокс-консорциум NRRL В-50286; криогель ПВС, включение в гель [169]	Очистка сточных вод свиноводческих ферм от соединений азота за счет анаэробного аммонийного окисления	Максимальное удаление $519 \pm 8$ мг N/л в сутки с возможностью активного функционирования в течение 30 суток
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BN10, криогель полиэтиленоксида и полиакриламида [171]	Биосинтез низкомолекулярных биосурфактантов (рамнолипидов)	Максимальный уровень продуцирования 4,2–4,6 г/л в течение 72–96 ч в зависимости от криогенно-структурированной матрицы
<i>Rhodococcus wratislawiensis</i> BN38; криогель гидроксипропилцеллюлозы/ поли(N-изопропилакридамида), абсорбция клеток из суспензии высушенным образцом криогеля [172]	Одновременная биодеградация фенола и <i>n</i> -гексадекана, присутствующих в среде культивирования клеток	Максимальная биодеградируемая на 100% концентрация фенола — 2,4 г/л за 72 ч в присутствии 2,4 г/л <i>n</i> -гексадекана; показано многократное (22–30 раз) использование иммобилизованных клеток для разложения 0,5 г/л фенола

Таблица 6.3 (продолжение)

Биообъект; криогенно-структурированный носитель; способ иммобилизации; [ссылка]	Цель применения	Комментарии к биокаталитическим свойствам иммобилизованных биообъектов
<i>Komagataeibacter xylinum</i> В-12429; криогель ПВС, включение в гель [175]	Получение бактериальной целлюлозы	Максимальная концентрация бактериальной целлюлозы 4,2 г сух. веществ/л (возможно 10 рабочих циклов, суммарно 60 суток без потери активности)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Т2; <i>Mucor circinelloides</i> F1627, <i>Aspergillus terreus</i> F728, <i>Rhizopus oryzae</i> F1032; криогель ПВС, включение в гель [176]	Получение фумаровой кислоты и этанола в условиях одновременного осахаривания и ферментации гидролизатов целлюлозосодержащего сырья	Биокатализаторы сохраняют высокую эффективность конверсии в целевые продукты при обработке целлюлозосодержащего сырья различными ионными жидкостями
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> В-5481; криогель ПВС, включение в гель [177]	Получение внеклеточного экзополисахарида — декстрана	Обеспечивает синтез декстрана со скоростью 4,2 г/л/ в час; возможно использование в 5 рабочих циклах
<i>Aureobasidium pullulans</i> Y-4137; криогель ПВС, включение в гель [178]	Получение внеклеточного экзополисахарида — пуллулана	Позволяет получение пуллулана из гидролизатов различных источников возобновляемого сырья (клубней топинамбура, древесины осины, биомассы микроводорослей <i>Chlorella vulgaris</i> , картофельной мезги) в ходе 15 рабочих циклов
<i>Pachysolen tannophilus</i> штаммы Y-2246, Y-475, Y-476, Y-3269; криогель ПВС, включение в гель [179]	Получение этанола из глицерина	Максимальная скорость накопления этанола в среде с глицерином — 640 мг/л в час; максимальная концентрация этанола — 25 г/л в ходе 10 рабочих циклов
<i>Rhizopus oryzae</i> F814, <i>Lactobacillus casei</i> В3960; криогель ПВС, включение в гель [180]	Получение L(+) — молочной кислоты	Выход целевого продукта — 82–93%; максимальный период применения биокатализаторов — 80 суток

Таблица 6.3 (продолжение)

Биообъект; криогенно-структурированный носитель; способ иммобилизации; [ссылка]	Цель применения	Комментарии к биокаталитическим свойствам иммобилизованных биообъектов
<i>Azotobacter vinelandii</i> В-10436; криогель ПВС, включение в гель [181]	Биосинтез внеклеточного полисахарида — бактериального альгината	Скорость накопления альгината — 35 мг/л в час; обеспечивается получение альгината с молекулярной массой 300-500 кДа
<i>Mucor circinelloides</i> F1627, <i>Fusarium oxysporum</i> F2313, <i>Fusarium solani</i> F819, <i>Aspergillus terreus</i> F728, <i>Aspergillus niger</i> F679, <i>Trichoderma atriviride</i> F207, <i>Trichoderma harzianum</i> F214, <i>Rhizopus oryzae</i> F873; криогель ПВС, включение в гель [182]	Получение комплекса целлюлаз, обладающих эндо- и экзоглюканазной, бета-глюкозидазной активностью, обеспечивающих гидролиз возобновляемого растительного сырья (кукурузные стебли, пшеничная и рисовая солома, березовые и дубовые опилки)	Синтезируемый комплекс целлюлаз характеризуется эндоглюканазой (7200 ед./л), экзоглюканазой (550 ед./л), бета-глюкозидазой (370 ед./л) активностью; период полуинактивации — до 40 суток (4-кратное использование биокатализаторов)
<i>Chlorella vulgaris</i> C-1; криогель ПВС, включение в гель [183]	Накопление биомассы зеленой микроводоросли для использования ее в качестве источника получения альтернативных топлив	Иммобилизованный инокулят обеспечивает накопление биомассы 330 мг с.в./л в сутки с постоянным биохимическим составом в средах на основе различных сточных вод
<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1048, <i>Chlorella</i> sp. K, <i>Chlorella vulgaris</i> LARG-87, <i>Chlorella pyrenoidosa</i> 82-n, криогель ПВС, включение в гель [184]	Биосенсорное определение присутствия тяжелых металлов и гербицидов в водных системах по изменению величины относительной переменной флуоресценции хлорофилла клеток	Позволяет детектировать присутствие экотоксикантов (ионов $Zn^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Hg^{2+}$ , гербицидов — атразина, диурона) при скорости потока в водной системе до 360 мл/ч, проводить наблюдение в отсутствие экотоксикантов в течение 60 суток при неизменном уровне флуоресценции хлорофилла иммобилизованных клеток

Таблица 6.3 (продолжение)

Биообъект; криогенно-структурированный носитель; способ иммобилизации; [ссылка]	Цель применения	Комментарии к биокаталитическим свойствам иммобилизованных биообъектов
<i>Methylosinus sporium</i> B-212; криогель ПВС, включение в гель [185]	Получение метанола путем окисления метана	Максимальное накопление метанола в концентрации 62 мг/л в течение 24 ч; суммарная удельная продуктивность за весь период использования — 5900 мкмоль MeOH/г биокатализатора
<i>Rhodobacter capsulatus</i> B10, <i>Rhodobacter sphaeroides</i> GL-1, <i>Rhodospirillum rubrum</i> 2R, <i>Rhodopseudomonas capsulata</i> , <i>Gloecapsa alpicola</i> CALU, криогель ПВС, включение в гель [186]	Конверсия продуктов разложения целлюлозы (смеси лактата и ацетата), образованных в темновой стадии, в водород и диоксид углерода в фотобиореакторе	Средняя продуктивность в фототрофных условиях по водороду — 0,35 мМ/ч в течение 360 суток периодического культивирования
<i>Pseudomonas species</i> 78, <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ /pTrcTE-OPH, <i>Escherichia coli</i> SG13009 [pREP4]/pTES-His-OPH; криогель ПВС, включение в гель [187]	Биоразложение метилфосфоновой кислоты — прекурсора синтеза фосфорорганических нейротоксинов — за счет разрыва С-Р-связи	Скорость разложения метилфосфоновой кислоты — 73-18 мг/л/ч, а ее эфиров 96-214 мг/л в час на протяжении 245-310 суток
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ /pTrcTE-OPH, <i>Chryseomonas luteola</i> , <i>Comamonas teastosteroni</i> B-1241, <i>Sinorhizobium meliloti</i> B-1010, <i>Pseudomonas stutzeri</i> B-1199, <i>Aspergillus awamory</i> F-9, <i>Aspergillus terreus</i> F-394, <i>Mucor circinelloides</i> F-1226; криогель ПВС, включение в гель [188-189]	Биотехнологическое разложение фосфорорганических соединений в составе реакционных масс, получаемых после химического уничтожения вещества типа Vx и их ферментативной обработки	Обеспечивает 100% разложение остаточных концентраций вещества типа Vx и 99% биоразложение всех фосфорорганических соединений в составе реакционных масс с разным химическим составом; возможно длительное функционирование — 60 суток

Таблица 6.3 (окончание)

Биообъект; криогенно-структурированный носитель; способ иммобилизации; [ссылка]	Цель применения	Комментарии к биокаталитическим свойствам иммобилизованных биообъектов
Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, способные дифференцироваться в клетки костной ткани (остеобласты); криогель желатина, модифицированный N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимидом); адгезия клеток на матрице [45]	Формирование метаболически активной костной ткани	Обеспечивает необходимую остеогенную дифференциацию клеток и формирование биокаталитически и метаболически активной ткани в течение 21 суток
Гепатоциты (Huh-7 и HepG2), полиэтиленгликоль-альгинат-желатиновый криогель, абсорбция в геле [190]	Формирование метаболически активной ткани клеток человеческой печени	Максимальная удельная концентрации секретируемых альбумина и мочевины в расчете на клетку достигается в течение 24 ч
Фибросаркома почек человека HT1080; криогель полиакриламида/желатина и полиакриламида/хитозана; адгезия клеток в объеме криогеля [191]	Биосинтез и секреция терапевтического белка (урокиназы)	Биосинтез урокиназы с активностью 1300 ед./мг белка в течение 30 суток
Фибробластные клетки NIH/3T3; криогель на основе сополимера поли-L-глутаминовой кислоты и поли-L-лизина; адгезия на криогеле [192]	Биосинтез белков-предшественников коллагена и эластина	Обеспечивает увеличение биомассы фибробластов в 5 раз в течение 14 суток
Клетки высокометаболической меланомы мыши B16/F10; криогель сополимера 2-аминоэтилметакрилата и альгината; адгезия на криогеле [193]	Регенерационная медицина — восстановление кожного покрова за счет синтеза привнесенными иммобилизованными клетками меланомы факторов роста клеток	Обеспечивает инвазивную (подкожную) доставку клеток и синтез ими факторов роста сосудистого эндотелия в течение 4-6 недель

Известно, что иммобилизация клеток — это широко распространенный в природе феномен, который приводит к фиксации клеток на поверхности или в объеме различных носителей. Это явление играет особую роль в стратегии клеточного выживания и сохранения максимального числа каталитических функций у клеток, формирующих высококонцентрированные популяции, составляющие основу биопленок и тканей. Попытки иссле-

дователей напрямую применять знания по классической микробиологии и биохимии для интерпретации результатов культивирования подобных многоклеточных образований, существование которых поддерживается теми или иными носителями, ярко высветили существующие пробелы в знаниях об этих биокаталитических системах, способах их контроля и управления ими.

В ходе многолетнего применения разных носителей для клеток и анализа получаемых результатов оказалось, что именно **криогенно-структурированные** матрицы максимально подходят для иммобилизации самых разных типов клеток микроорганизмов (природных и рекомбинантных клеток бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов, микроводорослей, существующих в аэробных или анаэробных условиях в виде индивидуальных культур или сложных по составу консорциумах), с точки зрения обеспечения их высокой выживаемости в процессе реализации самой методики получения таких систем, а также в процессе их длительного хранения [194]. Именно эти носители максимально приближены по своим характеристикам к тем, которые существуют в природе и формируются в микроокружении клеток, благодаря синтезируемым и секретируемым ими же биополимерам — белкам и полисахаридам [175, 178, 179, 181]. Отмеченная выше возможность варьирования формы получаемых образцов биокатализаторов в широком диапазоне (сфероподобные гранулы, частицы разнообразной формы, гелевые пластины, пористые блоки и др.), существенно расширяет области практического применения ГБК на основе криоструктурированных матриц.

### **Иммобилизованные инокуляты для биотехнологических процессов**

Одной из важнейших проблем различных биокаталитических систем является использование в высокой концентрации клеток микроорганизмов, осуществляющих разнообразные биотехнологические процессы. Как известно, исходная концентрация клеток (инокулята) как биокатализаторов обеспечивает определенную продуктивность процесса, характеризующуюся соответствующей скоростью накопления продукта в единицу времени (удельная продуктивность процесса) и общим уровнем накопления конечного продукта за весь временной интервал, отведенный для проведения процесса (выход продукта), в результате эффективной конверсии субстрата [195].

При введении клеток в высокой концентрации в реакционные среды часто наблюдается их агрегация, флокуляция, адгезия к различным поверхностям, что приводит к тому, что часть клеток оказывается функционально лимитированной по доступному субстрату присутствием в их

микроокружении большого числа «соседних» клеток. Процессы, использующие такие клеточные системы с высокой концентрацией биомассы свободных клеток, характеризуются сниженным уровнем основных характеристик в сравнении с суммарным эффектом, который может быть получен от систем, в которых применяются клетки, хорошо индивидуально распределенные в реакционном объеме [195]. Решить эту проблему позволяет только иммобилизация клеток в гелевые матрицы методом включения в процессе формирования гелей или в результате а(д)сорбции и адгезии клеток к заранее сформированному носителю, имеющему размер пор, достаточный для обеспечения эффективного проникновения клеток в матрицу и протекания массообменных процессов в объеме матрицы. Это позволяет получить относительно равномерно распределенные в пространстве и «зафиксированные» в таком состоянии клетки, исходно взятые в высокой концентрации. Для этого, как правило, используется один и тот же прием: биомассу клеток равномерно распределяют (суспендируют) в растворе полимера перед формированием матрицы на его основе и стараются это распределение максимально сохранить при формировании гелевой структуры. Вместе с этим именно такой подход позволяет получить образец гелевого носителя с гомогенно распределенным в нем биоматериалом.

Во многих обзорных работах при сравнении разных характеристик ИБК подчеркиваются преимущества криогелей перед другими гелевыми носителями, широко применяемыми исследователями для иммобилизации клеток [15, 17, 21]. Одним из значимых аргументов в пользу именно криогенно-сформированных носителей был размер пор, который можно варьировать при формировании носителя в зависимости от типа и размера клеток. Но в ряде случаев использования биокаталитических систем на основе иммобилизованных клеток оказалось, что варьирование размера пор крайне важно, с точки зрения возможности обеспечения регулируемого высвобождения (выхода) клеток из матрицы в определенных условиях. Это свойство криоструктурированных матриц позволяет их применять для приготовления иммобилизованных клеток, которые могут использоваться в качестве концентрированного инокулята [195]. Использование такого инокулята облегчает всем клеткам, входящим в его состав, пройти процесс адаптации к изменению среды, условиям культивирования, обеспечивает быстрый рост «дочерних» свободных клеток и накопление их биомассы в среде.

Особенно значимым является применение таких инокулятов, например, в случае клеток, чья скорость удвоения напрямую зависит от концентрации клеток в среде и увеличивается с повышением их числа. В частности, подобные явления характерны для клеток зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris*, способной расти в гетеротрофных условиях в средах,



представляющих собой сточные воды промышленности или сельского хозяйства [196]. При этом скорость накопления необходимого количества биомассы увеличивается в разы в сравнении с теми скоростями процесса, в котором применяется инокулят в виде свободных клеток.

Следует при этом отметить, что использование криогенно-структурированных матриц для иммобилизации клеток с целью их последующего применения в качестве инокулята не только обеспечивает успешное применение такого «биокатализатора» процесса накопления целевой биомассы клеток, но и позволяет длительно хранить такой инокулят в условиях, при которых происходит процесс криоформирования носителя. Это позволяет комбинировать процесс получения самого иммобилизованного инокулята и создавать условия для криоконсервации клеток в иммобилизованном состоянии. Длительность сохранения клетками их способности к пролиферации и проявлению метаболической активности в таком криоиммобилизованном состоянии наблюдается на протяжении нескольких лет [195, 197]. Хранение клеток в иммобилизованном состоянии при использовании в качестве носителей криогелевых матриц фактически имитирует природные условия и процессы, позволяющие клеткам длительно пребывать в анабиозе в условиях низких температур. При этом крайне важной является способность самих полимеров, формирующих матрицу в таких условиях оказывать криопротекторные свойства по отношению к клеткам. Интересно, что снижение концентрации раствора полимера, используемого для формирования матрицы, способствует образованию более крупных пор, через которые клетки легко могут выходить из носителя в среду и выполнять роль инокулята, но при этом уменьшается степень выживаемости клеток при замораживании/оттаивании и их криохранении, поскольку, очевидно, уменьшается криопротекторная эффективность самого полимера в результате снижения его концентрации в микроокружении клеток в процессе иммобилизации [39].

Можно отметить, что сохранение клеток в иммобилизованном состоянии не только для их использования в качестве инокулята, но и в качестве биокатализаторов самых разных процессов в условиях низких температур после криоформирования носителя обладает практической значимостью, так как может эффективно использоваться для сохранения разнообразных ИБК в течение длительного времени с возможностью их размораживания в любой необходимый момент времени с целью введения в основной биотехнологический процесс.

При этом длительность сохранения криоиммобилизованными клетками их биологических характеристик (биокаталитических активностей и способности к размножению) зависит, как оказалось, от самого полиме-

ра, его исходной концентрации, применяющейся для формирования криоструктурированной матрицы и определяющей ее пористость, а также от температуры замораживания, от концентрации самих клеток в составе такого гетерогенного биокатализатора, от типа иммобилизуемых клеток и, наконец, от среды, на основе которой готовится исходный раствор полимера, подлежащий криоструктурированию [195–197]. Как оказалось, все эти факторы необходимо строго учитывать для сохранения желаемых свойств создаваемых ИБК.

### **Основные иммобилизованные биокатализаторы для различных биотехнологических процессов (рекомбинантные, природные, споровые, вегетативные клетки)**

Сегодня существует масса фактов, доказанных различными исследователями на примере разнообразных клеток микроорганизмов, животных и даже растений, подтверждающих преимущества ГБК на основе иммобилизованных клеток перед свободными клетками, традиционно используемыми в разных биотехнологических процессах, а именно: их высокая операционная стабильность, резистентность к воздействию негативных факторов, продолжительные временные периоды активного каталитического действия, высокие выходы целевых продуктов (табл. 6.3). Одна из причин таких свойств иммобилизованных клеток состоит в позитивном влиянии самого носителя на характеристики, проявляемые клетками.

Безусловно, это относится в первую очередь и к криогенно сформированным матрицам, обладающим хорошей пористостью, постоянными механическими характеристиками. Так, в частности, позитивное влияние криогель ПВС оказывает своим присутствием на метаболическую активность клеток мицелиальных грибов, для которых характерен адгезивный рост на различных твердых поверхностях. При этом для крупнопористых носителей нарастающий внутри пор мицелий формирует пространственные более «рыхлые» структуры, с меньшей плотностью упаковки мицелия, чем свободный мицелий в суспензионной культуре [198, 199]. В этом случае стенки пор матрицы «разобщают» растущие гифы и удерживают их в таком состоянии, позволяя сохранять их пространственную упаковку, компартментализацию и разделение стенками пор. Такая «несжимающаяся», «армированная» пористым носителем высокоплотная упаковка гиф обеспечивает получение ГБК на основе иммобилизованного мицелия, который, благодаря своей морфологии, сложившейся внутри матрицы при заданных условиях прорастания спор, обладает большой продуктивностью и стабильностью функционирования. Причина — в обеспечении удовлетворительных условий массообмена для клеток со средой культивирования.

Многие годы основными объектами исследования иммобилизованных клеток были бактерии и дрожжи (табл. 6.3). Потребность в увеличении эффективности получения ферментных препаратов для нужд промышленности и сельского хозяйства (амилазы, протеазы, целлюлазы, органофосфатгидролаза и др.) привели исследователей к необходимости разработки стабильных биосинтетических систем на основе иммобилизованных клеток мицелиальных грибов, обеспечивающих секрецию разных целевых ферментов.

В случае иммобилизации грибов в качестве объекта для иммобилизации используются споры (при иммобилизации спорообразующих грибов) или измельченный мицелий (для неспорообразующих культур) [198, 199]. Однако именно использование спор, устойчивых к воздействию различных факторов в силу строения своей внешней оболочки [200], для разработки иммобилизованных ГБК, обеспечивает их более высокий уровень выживаемости при любых неблагоприятных условиях проведения иммобилизации. В силу этого споры мицелиальных грибов получили наибольшее распространение как объект иммобилизации.

Анализ современных публикаций позволил выделить два основных подхода к разработке различных ГБК на основе иммобилизованных клеток мицелиальных грибов, применяемых исследователями. Согласно первому подходу, первоначально получают частицы носителя с включенными внутрь спорами (так как споры обладают повышенной устойчивостью к внешним воздействиям, этот метод эффективен даже в том случае, если процесс иммобилизации проходит в жестких условиях, например в присутствии органических растворителей, токсичных мономеров), затем иммобилизованные споры проращивают, обеспечивая возможность нарастающему мицелию гриба пронизывать поры используемой матрицы [159, 169, 173, 180, 182, 188].

При реализации второго подхода споры и носитель одновременно помещают в питательную среду и проводят культивирование клеток, в ходе которого часть спор через поры абсорбируется матрицей носителя, при этом мицелий в процессе роста адгезируется к стенкам пор матрицы [199]. На практике среди исследователей преференций в пользу одного или другого метода иммобилизации спор грибов нет, так как главное — это получение каталитически активного ГБК на основе сформировавшегося развитого мицелия при использовании определенного криогенно структурированного носителя, исходно удерживающего споры.

Другой важной тенденцией разработок разных ГБК на основе криоструктурированных матриц, которая сложилась за последние годы, стала иммобилизация консорциумов клеток [160, 169, 188-189], в которой метаболиты одних клеток становятся субстратами для других в гетерогенной и сложной по своему составу клеточной биокаталитической системе.

Следует выделить также в отдельное направление создаваемых ГБК на основе иммобилизованных клеток — биокатализаторы на основе рекомбинантных клеток [187–189]. Применение генно-модифицированных клеток на практике сдерживается не только теоретическими доводами в пользу возможного нанесения ущерба окружающей среде и существующему биоразнообразию подобными биокаталитическими системами, но и нестабильностью самих этих систем в реальных условиях возможного их применения. Проведенные исследования показали, что увеличение концентрации рекомбинантных клеток в единице объема (в гранулах криоструктурированных матриц) позволяет существенным образом поднять стабильность генетически привнесенных признаков в клетки, длительно сохранять эти клетки в результате криоконсервации в объеме полимерных носителей [194].

Глубокое исследование и понимание условий регуляции свойств клеток фотобактерий и разнообразных фотосинтетиков, в частности, микроводорослей, позволило за последнее десятилетие перейти к их иммобилизации в криоструктурированные матрицы с целью создания биокаталитических систем, применение которых возможно для детекции разнообразных экотоксикантов (тяжелых металлов, пестицидов, фенольных соединений, углеводородов нефти) [22, 175, 184, 197]. В результате таких разработок появились уникальные по своим характеристикам биоиндикаторные элементы в новых биосенсорных системах, применение которых возможно в том числе и в природных проточных системах для экологической оценки состояния окружающей среды.

Особое внимание и интерес вызывают разработки в области клеток, иммобилизованных в/на криоструктурированных матрицах, основанные на использовании самых разных животных клеток, поскольку такие исследования ориентированы на решение современных вопросов регенеративной медицины и биосинтеза белков, гормонов, необходимых клеткам человека для восстановления своих сниженных или утраченных функций, а также для восстановления тканей [43, 45, 101–103, 190–193]. В этой области применение криогенно сформированных матриц является особенно привлекательным, так как варьирование и комбинирование разных полимерных материалов, использование возможностей их химической активации, создание матриц разной формы, размера и пористости позволяет создавать системы для объемного, так называемого 3D-культивирования клеток животных или человека, обеспечивать их быструю пролиферацию и дифференциацию в нужные ткани с приобретением необходимых функциональных характеристик.

Следует отметить, что именно это направление применения криоструктурированных матриц развивается в последние годы особенно активно,

объединяя в экспериментальных исследованиях по так называемой медицинской биотехнологии специалистов из самых разных областей науки и делая эти исследования поистине междисциплинарными. Основной задачей в этой области исследований пока остается обеспечение длительного сохранения иммобилизованными животными клетками своей жизнеспособности, функциональной активности, а также крайне интересной является задача получения и длительного хранения этих клеток в таком состоянии до момента непосредственного применения *in vivo*.

Таковы основные современные тенденции развития биокаталитических систем, где в качестве носителей иммобилизованных клеток применяются криогенно-структурированные полимерные матрицы, которые сегодня можно выделить среди огромного множества проводимых в этой области исследований, использующих самые разные живые клетки в качестве максимально эффективных ИБК разнообразных биотехнологических процессов.

## Заключение

Таким образом, технически довольно простые приемы криогенного структурирования полимеров позволяют получать самые разнообразные носители для иммобилизации молекул и клеток. Накопленная сейчас в результате фундаментальных исследований информация о механизмах криогенного формирования разнообразных матриц [6–18, 37–40, 49, 50, 54, 73, 93, 94, 201] предоставляет разработчикам иммобилизованных биокатализаторов широкий выбор таких матриц в качестве носителей, методов регулирования их физических, химических и биокаталитических характеристик. Кроме того, поскольку при замораживании исходно жидкой системы (молекулярный раствор или коллоидная дисперсия) она приобретает ту форму, в пределах которой замерзает, то и создаваемый криогенно-структурированный материал имеет ту же геометрию, например, в виде плоского блока, цилиндра, гранул и т. п. Таким образом, соответствующий ИБК будет в наибольшей степени отвечать операционным требованиям биотехнологического процесса или устройства (например, биосенсора), где такому биокатализатору предстоит функционировать.

Криогенно-структурированные носители предоставляют широкие возможности для создания эффективных биокаталитических систем на основе различных ферментов, необходимых для решения самых разнообразных задач. Такие биокатализаторы зачастую обладают серьезными преимуществами, так как сама иммобилизация позволяет существенно увеличить их стабильность и многократно использовать в технологических операциях. Ферменты, со своей стороны, делают возможным использование биока-

тализаторов в мягких условиях и характеризуются гораздо более высокой каталитической эффективностью даже по сравнению с классическими катализаторами, зачастую позволяя существенно упрощать проведение сложных процессов. К этим преимуществам также добавляются те плюсы, которые привносятся криоструктурированными носителями, а именно: отсутствие ограничений для массообмена, возможность использования высоких скоростей потока, простота получения и масштабируемость.

К настоящему времени предложено и апробировано большое число способов иммобилизации ферментов в/на криоструктурированных носителях. И дальнейшие перспективы создания новых иммобилизованных ферментных биокатализаторов тесно связаны с достижениями в других областях знаний. Например, для увеличения механической прочности биокатализаторов могут быть использованы композитные материалы, в частности, известно, что введение в состав носителя наночастиц  $TiO_2$  существенно увеличивает прочность криогелей [202], а также улучшаются сорбционные характеристики таких композитных носителей [203]. Причем добавки могут вводиться в криогели не только в виде наночастиц и нанотрубок, но и в виде микро- или субмикрочастиц [148–150].

Уже сейчас на основе криоструктурированных носителей созданы био-препараты для доставки лекарств, а также ферментов, и для их контролируемого медленного высвобождения [122]. Можно ожидать, что аналогичные системы будут созданы в большом количестве в ближайшем будущем.

Еще одним направлением применения криоструктурированных матриц, развитие которого можно вскоре ожидать, является протеомный анализ клеток с применением пористых подложек [204] и создание мультиферментных систем.

В целом, можно заключить, что иммобилизованные ферментные и клеточные биокатализаторы, полученные с использованием криоструктурированных носителей, находятся на подъеме в своем развитии и применении. Их разработка позволяет открывать новые перспективы в создании и применении на практике оригинальных биокатализаторов с уникальными характеристиками, которые предопределяются не только новыми разновидностями криосформированных матриц, но и свойствами новых объектов исследований — ферментов и белков, а также клеток животных, микроорганизмов, в том числе рекомбинантных.

Работа выполнена в рамках темы (№ АААА-А16-116052010081-5).

## Авторы

**Ефременко Елена Николаевна**, д.б.н., профессор, зав. лаб. МГУ имени М.В. Ломоносова, ст. науч. сотр. ИБХФ РАН; elena\_efremenko@list.

ги. Область научных интересов: биохимия, биофизика клеток и белков, биотехнологические процессы с использованием иммобилизованных клеток.

**Лягин Илья Владимирович**, к.х.н., ст. науч. сотр. МГУ имени М.В. Ломоносова, науч. сотр. ИБХФ РАН. Область научных интересов: биохимия, свободные и иммобилизованные ферменты, биотехнология.

**Лозинский Владимир Иосифович**, д.х.н., профессор, зав. лаб. ИНЭОС РАН; loz@ineos.ac.ru. Область научных интересов: криоструктурирование полимерных систем, криогели и криоструктураты на основе синтетических и природных полимеров, практическое применение криогенно-структурированных полимерных материалов.

## Литература

1. Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach / edited by Woodward J. — Oxford: IRL Press, 1985. — 177 p.
2. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К., Можжаев В.В., Хмельницкий Ю.Л. Иммобилизованные ферменты. — М.: Высшая школа, 1987. — 159 с.
3. Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. — М.: Изд-во МГУ, 1994. — 288 с.
4. Халгаш Я. Биокатализаторы в органическом синтезе (пер. со словацк.). — М.: Мир, 1991. — 204 с.
5. Sheldon R.A., van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. — Chem. Soc. Rev., 2013, **42**, 6223.
6. Лозинский В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения. — Успехи химии. 2002, **71**, 559.
7. Lozinsky V.I., Galaev I. Yu., Plieva F.M., Savina I.N., Jungvid H., Mattiasson B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. — Trends in Biotechnol., 2003, **21**, 445.
8. Gun'ko V.M., Savina I.N., Mikhalovsky S.V. Cryogels: morphological, structural and adsorption characterisation. — Adv. Colloid Interface Sci., 2013, **187–188**, 1.
9. Lozinsky V.I. A brief history of polymeric cryogels. — Adv. Polym. Sci., 2014, **263**, 1.
10. Reichelt S. Introduction to macroporous cryogels. — Methods Mol. Biol., 2015, **1286**, 173.
11. Лозинский В.И., Подорожко Е.А., Никитина Я.Б., Клубукова Л.Ф., Васильев В.Г., Бурмистров А.А., Кондратов Ю.Г., Васильев Н.К. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 45. Влияние пористости дисперсного наполнителя на физико-химические характеристики композитных криогелей поливинилового спирта. — Коллоидный журнал, 2017, **79**, 449.
12. Лозинский В.И., Вакула А.С., Зубов А.Л. Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. IV. Обзор литературных данных. — Биотехнология, 1992, **4**, 5.
13. Varfolomeev S.D., Rainina E.I., Lozinsky V.I. Cryoimmobilized enzymes and cells in organic synthesis. — Pure Appl. Chem., 1992, **64**, 1193.
14. Kaetsu I. Radiation synthesis of polymeric materials for biomedical and biochemical applications. — Adv. Polym. Sci., 1993, **105**, 81.
15. Lozinsky V.I., Plieva F.M. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. — Enzyme Microb. Technol., 1998, **23**, 227.

16. *Lozinsky V.I., Plieva F.M., Galaev I.Yu., Mattiasson B.* The potential of polymeric cryogels in bioseparation. — *Bioseparation*. 2001, **10**, 163.
17. *Lozinsky V.I.* What new opportunities the use of diverse polymeric cryogels opens for the immobilization of molecules and cells. — *Hemijaska Industrija (Chemical Industry, Belgrade)*, 2004, **58**, 111.
18. *Лозинский В.И.* Новое семейство макропористых и сверхмакропористых материалов биотехнологического назначения — полимерные криогели. — *Известия АН, Сер. хим.*, 2008, № 5, 996.
19. *Efremenko E.N., Senko O.V., Zubaerova D.H., Podorozhko E.A., Lozinsky V.I.* Effective immobilized biocatalyst for the treatment of various foodwasters. 103–110. — in *Biotechnology: State of the Art and Prospects for Development / edited by Zaikov G.E.* — N.Y.: Nova Science Publishers Inc., 2008. — 217 p.
20. *Plieva F.M., Galaev I.Y., Noppe W., Mattiasson B.* Cryogel applications in microbiology. — *J. Microb. Meth.*, 2008, **16**, 543.
21. *Mattiasson B.* Cryogels for biotechnological applications. — *Adv. Polym. Sci.*, 2014, **263**, 245.
22. *Исмаилов А.Д., Алескерова Л.Э.* Фотобиосенсоры, содержащие люминесцентные бактерии. — *Биохимия*, 2015, **80**, 867.
23. *Choudhury S., Connolly D., White B.* Supermacroporous polyHIPE and cryogel monolithic materials as stationary phases in separation science: a review. — *Anal. Meth.*, 2015, **7**, 6967.
24. *Efremenko E.N., Lyagin I.V., Lozinsky V.I.* Enzymatic biocatalysts immobilized on/in the cryogel-type carriers. 301–324. — in *Supermacroporous Cryogels: Biomedical and Biotechnological Applications / edited by Kumar A.* — Boca Raton, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, 2016. — 464 p.
25. *Belokon Yu.N., Kochetkov K.A., Plieva F.M., Ikonnikov N.S., Maleev V.I., Parmar V.S., Kumar R., Lozinsky V.I.* Enantioselective hydrolysis of a Schiff's base of D,L-phenylalanine ethyl ester in water-poor media through the reaction catalyzed with  $\alpha$ -chymotrypsin immobilized in hydrophilic macroporous gel support. — *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2000, **88**, 97.
26. *Plieva F.M., Kochetkov K.A., Singh I., Parmar V.S., Belokon' Yu.N., Lozinsky V.I.* Immobilization of hog pancreas lipase in macroporous PVA-cryogel carrier for the biocatalysis in water-poor media. — *Biotechnol. Lett.*, 2000, **22**, 551.
27. *Bacheva A.V., Plieva F.M., Lysogorskaya E.N., Filippova I.Yu., Lozinsky V.I.* Peptide synthesis in organic media with subtilisin 72 immobilized on poly(vinyl alcohol)-cryogel carrier. — *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 1005.
28. *Филлипова И.Ю., Бачева А.В., Байбак О.В., Плиева Ф.М., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Лозинский В.И.* Новые биокатализаторы для синтеза пептидов в органической среде — протеиназы, иммобилизованные на криогеле поливинилового спирта. — *Известия АН, Сер. хим.*, 2001, **10**, 1811.
29. *Бачева А.В., Байбак О.В., Беляева А.В., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Лозинский В.И., Филлипова И.Ю.* Нативный и модифицированный субтилизин 72 как катализатор синтеза пептидов в средах с низким содержанием воды. — *Биоорганическая химия*, 2003, **29(5)**, 551.
30. *Markvicheva E.A., Lozinsky V.I., Plieva F.M., Kochetkov K.A., Rumsh L.D., Zubov V.P., Maity J., Kumar R., Parmar V.S., Belokon Yu.N.* Gel-immobilized enzymes as promising biocatalysts: results from Indo-Russian collaborative studies. — *Pure Appl. Chem.*, 2005, **77**, 227.
31. *Лысогорская Е.Н., Рослякова Т.В., Беляева А.В., Бачева А.В., Лозинский В.И., Филлипова И.Ю.* Получение и биокаталитические свойства трипсина, иммобилизован-



- ного на криогеле поливинилового спирта. — Прикладная биохимия и микробиология, 2008, 44(3), 270.
32. Коршак В.В., Штальман М.И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. — М.: Наука, 1984. — 261 с.
  33. Егоров Н.С., Самуилов В.Д. Биотехнология. — М.: Высшая школа, 1987, Кн.1. — 159 с.
  34. Smart Polymers for Bioseparation and Bioprocessing / edited by Galaev I., Mattiasson B. — London — New York: Taylor & Francis Publ., 2002. — 292 p.
  35. Temenoff J.S., Mikos A.G. Biomaterials: the intersection of biology and materials science. — New Jersey: Pearson, 2008. — 504 p.
  36. Биосовместимые материалы / под ред. Севастьянова В.И., Кирпичникова М.П. — М.: Изд-во «МИА», 2011. — 544 с.
  37. Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В. Способ получения макропористых полимерных материалов. — А.с. СССР № 1008214 (1982), Б.И. № 12 (1983).
  38. Рогожин С.В., Вайнерман Е.С., Лозинский В.И. Образование пространственно-сшитых полимерных структур при замораживании реагирующей системы. — Докл. АН СССР, 1982, 263, 115.
  39. Лозинский В.И., Сименел И.А., Чебышев А.В. Способ получения пористого материала. — Пат. РФ № 2035476 (1994); Б.И. № 14 (1995).
  40. Лозинский В.И., Зубов А.Л. Способ получения макропористого полимерного материала. — Пат. РФ № 2078099 (1994); Б.И. № 12 (1997).
  41. Petrenko Yu.A., Ivanov R.V., Petrenko A. Yu., Lozinsky V.I. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells. — J. Mater. Sci., Mater. Med., 2011, 22, 1529.
  42. Katsen-Globa A., Meiser I., Petrenko Yu.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Zimmermann H., Petrenko A.Yu. Towards a ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds. — J. Mater. Sci. Mater. Med., 2014, 25, 857.
  43. Лозинский В.И., Кулакова В.К., Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Ершов А.Г., Суханов Ю.В. Композиция для формирования макропористого носителя, используемого при трехмерном культивировании клеток животных или человека, и способ получения указанного носителя. — Пат РФ № 2594427 (2015); Б.И. № 23 (2016).
  44. Rodionov I.A., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Ya., Shabatina T.I., Lozinsky V.I. Cryostructuring of polymer systems. 44. Freeze-dried and then chemically cross-linked wide porous cryostructures based on serum albumin. — e-Polymers, 2017, 17, 263.
  45. Lozinsky V.I., Kulakova V.K., Ivanov R.V., Petrenko A. Yu., Rogulska O. Yu., Petrenko Yu.A. Cryostructuring of polymer systems. 47. Preparation of wide porous gelatin-based cryostructures in sterilizing organic media and assessment of the suitability of thus formed matrices as spongy scaffolds for 3D cell culturing. — e-Polymers. 2018, 18, 175.
  46. Тенел А. Химия и физика молока. — М.: Изд-во «Пищевая промышленность», 1979. — С. 42–54.
  47. Плиева Ф.М. Иммобилизация биологических молекул в макропористых носителях на основе поливинилового спирта. — Дисс. канд. хим. наук, М.: ИНЭОС РАН, 1997. — 139 с.
  48. Lozinsky V.I., Plieva F.M., Zubov A.L. New possibilities for the implementation of PVA-cryogel carriers: Supermacroporous supports of immobilized macromolecules. — Proceedings of the International Workshop "Bioencapsulation VIII", Trondheim, 1999, O5/1-5.

49. *Lozinsky V.I., Okay O.* Basic principles of cryotropic gelation. — *Adv. Polym. Sci.*, 2014, **263**, 49.
50. *Okay O., Lozinsky V.I.* Synthesis, structure-property relationships of cryogels. — *Adv. Polym. Sci.*, 2014, **263**, 103.
51. *Лозинский В.И., Дамикалн Л.Г., Шаскольский Б.Л., Бабушкина Т.А., Курочкин И.Н., Курочкин И.И.* Изучение криоструктурирования полимерных систем. 27. Физико-химические свойства криогелей поливинилового спирта и особенности их макропористой морфологии. — Коллоидный журнал, 2007, **69(6)**, 798.
52. *Stanescu M.D., Sanislav A., Ivanov R.V., Hirtopeanu A., Lozinsky V.I.* Immobilized laccase on a new cryogel carrier and kinetics of two anthraquinone derivatives oxidation. — *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2011, **165(7-8)**, 1789.
53. *Никоноров В.В., Иванов Р.В., Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И.* Влияние молекулярной массы полимерного предшественника на особенности формирования и свойства ковалентно-сшитых хитозановых криогелей. — *Высокомолекулярные соединения*, сер. А, 2011, **53(12)**, 2067.
54. *Лозинский В.И.* Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и применение. — Дисс. докт. хим. наук, М.; ИНЭОС РАН, 1994. — 682 с.
55. *Подорожко Е.А., Дьяконова Е.А., Лозинский В.И.* Изучение криоструктурирования полимерных систем. 37. Композитные криогели, сформированные из дисперсий бутадиен-стирольного латекса в водном растворе поливинилового спирта. — Коллоидный журнал, 2015, **77(1)**, 52.
56. *Ariga O., Kubo T., Sano Y.* Effective diffusivity of glucose in PVA hydrogel. — *Ferment. Bioeng.*, 1994, **78**, 200.
57. *Лозинский В.И., Плиева Ф.М., Зубов А.Л.* Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. V. Сверхмакропористые носители для иммобилизации молекул. — *Биотехнология*, 1995, № 1–2, 32.
58. *Gordon M.J., Chu K.C., Margaritis A., Martin A.J., Ethier C.R., Rutt B.K.* Measurement of Gd-DTPA diffusion through PVA hydrogel using a novel magnetic resonance imaging method. — *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, **65**, 459.
59. *Szczesna M., Galas E., Bielecki S.* PVA catalyst with entrapped *Bacillus subtilis* cells. — *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2001, **11**, 671.
60. *Лозинский В.И., Плиева Ф.М., Исаева Е.И., Зубов А.Л.* Способ концентрирования вируса. — Пат. РФ № 2130069 (1997); Б.И. № 13 (1999).
61. *Плиева Ф.М., Исаева Е.И., Лозинский В.И.* Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. VI. Биоаффинные сорбенты на основе сверхмакропористого носителя для работы с вирусными частицами. — *Биотехнология*, 1998, № 5, 32.
62. *Луста К.А., Старостина Н.Г., Горкина Н.Б., Физте Б.А., В.И.Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* Иммобилизация клеток *E. coli* в макропористые криогели на основе полиакриламида. — *Прикладная биохимия и микробиология*, 1988, **24**, 504.
63. *Efremenko E.N., Lozinsky V.I., Sergeeva V.S., Plieva F.M., Makhlis T.A., Kazankov G.M., Gladilin A.K., Varfolomeyev S.D.* Addition of Polybrene improves stability of organophosphate hydrolase immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogel carrier. — *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2002, **51**, 195.
64. *Бачева А.В., Вайбак О.В., Беляева А.В., Оксенойт Е.С., Величко Т.И., Лысогорская Е.Н., Гладилин А.К., Лозинский В.И., Филиппова И.Ю.* Активность и стабильность нативного и модифицированного субтилизина в различных средах. — *Биохимия*. 2003, **68**, 1567.

65. *Bacheva A. V., Belyaeva A. V., Lysogorskaya E. N., Oksenoit E. S., Lozinsky V. I., Filippova I. Yu.* Biocatalytic properties of native and immobilized subtilisin 72 in aqueous-organic and low water media. — *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2005, **32**, 253.
66. *Беляева А.В., Бачева А.В., Оксенойт Е.С., Лысогорская Е.Н., Лозинский В.И., Филппова И.Ю.* Синтез пептидов в органической среде при использовании субтилизина 72, иммобилизованного на криогеле поливинилового спирта. — *Биоорганическая химия*, 2005, **31**, 586.
67. *Аникина О.М., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Лозинский В.И., Филппова И.Ю.* Субтилизин Карлсбег в комплексе с SDS — эффективный катализатор для твердофазной сегментной конденсации пептидов на криогеле поливинилового спирта. — *Биоорганическая химия*, 2008, **34**, 365.
68. *Беляева А.В., Смирнова Ю.А., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Тимофеева А.В., Лозинский В.И., Филппова И.Ю.* Биокаталитические свойства термоллизина, иммобилизованного на криогеле поливинилового спирта. — *Биоорганическая химия*, 2008, **34**, 487.
69. *Stanescu M.D., Fogorasi M., Shaskolskiy B.L., Gavrilas S., Lozinsky V.I.* New potential biocatalysts by laccase immobilization in PVA cryogel type carrier. — *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, **160**, 1947.
70. *Stanescu M.D., Gavrilas S., Ludwig R., Haltrich D., Lozinsky V.I.* Preparation of immobilized *Trametes pubescens* laccase on a cryogel-type polymeric carrier and application of the biocatalyst to apple juice phenolic compounds oxidation. — *Eur. Food Res. Technol.*, 2012, **234**, 655.
71. *Watase M.* Effect of degree of polymerization, degree of saponification and concentration on rheological properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by repeated freezing and melting. — *Nippon Kagaku Kaishi*, 1983, **9**, 1254.
72. *Watase M., Nishinari K.* Effect of the degree of saponification on the rheological and thermal properties of poly(vinyl alcohol) gels. — *Makromol. Chem.*, 1989, **190**, 155.
73. *Лозинский В.И.* Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта. — *Успехи химии*, 1998, **67**, 641.
74. *Lozinsky V.I., Damshkaln L.G., Kurochkin I.N., Kurochkin I.I.* Cryostructuring of polymeric systems. 36. Poly(vinyl alcohol) cryogels prepared from solutions of the polymer in water/low-molecular alcohol mixtures. — *Eur. Polym. J.*, 2014, **53**, 189.
75. *Lozinsky V.I., Solodova E.V., Zubov A.L., Simenel I.A.* Study of cryostructuration of polymer systems. XI. The formation of PVA cryogels by freezing-thawing the polymer aqueous solutions containing additives of some polyols. — *J. Appl. Polym. Sci.*, 1995, **58**, 171.
76. *Yatawara K., Mitsuishi M., Fukuda M., Tanigami T., Hoesi Y., Matsuzawa S.* Effect of addition of saccharose on gelation of aqueous poly(vinyl alcohol) solutions. — *J. Appl. Polym. Sci.*, 1995, **56**, 653.
77. *Lozinsky V.I., Domotenko L.V., Zubov A.L., Simenel I.A.* Study of cryostructuration of polymer systems. XII. Poly(vinyl alcohol) cryogels: influence of low-molecular electrolytes. — *J. Appl. Polym. Sci.*, 1996, **61**, 1991.
78. *Лозинский В.И., Сахно Н.Г., Дамшквалн Л.Г., Бакеева И.В., Зубов В.П., Курочкин И.Н., Курочкин И.И.* Изучение криоструктурирования полимерных систем. 31. Влияние добавок хлоридов щелочных металлов на физико-химические свойства и морфологию криогелей поливинилового спирта. — *Коллоидный журнал*, 2011, **73**, 225.
79. [http://www1.lsbu.ac.uk/water/kosmotropes\\_chaotropes.html#r1567](http://www1.lsbu.ac.uk/water/kosmotropes_chaotropes.html#r1567)
80. *Kolosova O. Yu., Kurochkin I.N., Kurochkin I.I., Lozinsky V.I.* Cryostructuring of polymeric systems. 48. Influence of organic chaotropes and kosmotropes on the cryotropic gel-formation of aqueous poly(vinyl alcohol) solutions. — *Eur. Polym. J.*, 2018, **102**, 169.

81. Kobayashi M., Ando I., Ishii T., Amiya S. Structural and dynamical studies of poly(vinyl alcohol) gels by high-resolution solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. — J. Mol. Struct., 1998, **440**, 155.
82. Hassan C.M., Peppas N.A. Structure and application of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking and by freezing/thawing methods. — Adv. Polym. Sci., 2000, **153**, 37.
83. Gutiérrez M.C., Aranaz I., Ferrer M.L., del Monte F. Production and properties of poly(vinyl alcohol) cryogels: recent developments. 83-115. — in Macroporous Polymers: Production, Properties and Biological/Biomedical Applications / edited by Mattiasson B., Kumar A., Galaev I. — Boca Raton: CRC Press, 2010. — 530 p.
84. De Rosa C., Auriemma F., Di Girolamo R. Kinetic analysis of cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol)/water solutions by small-angle neutron scattering. — Adv. Polym. Sci., 2014, **263**, 159.
85. Домотенко Л.В., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В. Влияние режимов замораживания водных растворов поливинилового спирта и условий размораживания образцов на свойства получающихся при этом криогелей. — Высокомолекулярные соединения, сер. А, 1988, **30**, 1661.
86. Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Домотенко Л.В., Блюменфельд А.Л., Рогов В.В., Барковская Е.Н., Федин Э.И., Рогожин С.В. Характерные особенности замерзания концентрированных водных растворов поливинилового спирта; взаимосвязь со свойствами гидрогелей, получающихся после оттаивания. — Коллоидный журнал, 1989, **51**, 685.
87. Лозинский В.И., Домотенко Л.В., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В. Некоторые термомеханические свойства криогелей поливинилового спирта. — Высокомолекулярные соединения, сер. А, 1989, **31**, 1805.
88. Lozinsky V.I., Zubov A.L., Savina I.N., Plieva F.M. Study of cryostructuring of polymer systems. XIV. Poly(vinyl alcohol) cryogels: Apparent yield of the freeze-thaw-induced gelation of concentrated aqueous solutions of the polymer. — J. Appl. Polym. Sci., 2000, **77**, 1822.
89. Lozinsky V.I., Damshkaln L.G. Study of cryostructuring of polymer systems. XVII. Poly(vinyl alcohol) cryogels: dynamics of the cryotropic gel-formation. — J. Appl. Polym. Sci., 2000, **77**, 2017.
90. Лозинский В.И., Дамшкalin Л.Г., Курочкин И.Н., Курочкин И.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 33. Влияние скорости охлаждения водных растворов поливинилового спирта при их замораживании на физико-химические свойства и пористую структуру получаемых криогелей. — Коллоидный журнал, 2012, **74**, 343.
91. Yakoyama F., Masada I., Shimamura K., Ikawa T., Monobe K. Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting. — Coll. Polym. Sci., 1986, **264**, 595.
92. Watase M., Nishinari K. Thermal and rheological properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by repeated cycles of freezing and thawing. — Makromol. Chem., 1988, **189**, 871.
93. Nambu M. Rubber-like poly(vinyl alcohol) gel. — Kobunshi Ronbunshu, 1990, **47**, 695.
94. Peppas N.A., Stauffer S.R. Reinforced uncrosslinked poly(vinyl alcohol) gels produced by cyclic freezing-thawing processes: a short review. — J. Control. Release, 1991, **16**, 305.
95. Stauffer S.R., Peppas N.A. Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing. — Polymer, 1992, **33**, 3932.

96. *Mori Y., Tokura H., Yoshikawa M.* Properties of hydrogels synthesized by freezing and thawing aqueous polyvinyl alcohol solutions and their applications. — *J. Mater. Sci.*, 1997, **32**, 491.
97. *Willcox P.J., Howie D.W., Schmidt-Rohr K., Hoagland D.A., Gido S.P., Pudjijanto S., Kleiner L.W., Venkatraman S.* Microstructure of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by freeze/thaw cycling. — *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.*, 1999, **37**, 3438.
98. *Лозинский В.И., Дамшкalin Л.Г., Курочкин И.Н., Курочкин И.И.* Изучение криоструктурирования полимерных систем. 28. Физико-химические свойства и морфология криогелей поливинилового спирта, сформированных многократным замораживанием-оттаиванием. — *Коллоидный журнал*, 2008, **70**, 212.
99. *Нейман Р.Э.* Коагуляция синтетических латексов. Воронеж. Изд-во Воронежского ун-та, 1967. — С. 148–159.
100. *Bloch K., Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Yavriyantz K., Vorobeychik M., Azarov D., Damshkalin L.G., Mattiasson B., Vardi P.* Functional activity of insulinoma cells (INS-1E) and pancreatic islets cultured in agarose cryogel sponges. — *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2005, **75**, 802.
101. *Петренко Ю.А., Петренко А.Ю., Дамшкalin Л.Г., Волкова Н.А., Лозинский В.И.* Рост и адипогенная дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток костного мозга при культивировании в трехмерных макропористых губках на основе криогеля агарозы. — *Клеточные технологии в биологии и медицине*, 2008, **3**, 141.
102. *Lozinsky V.I., Damshkalin L.G., Bloch K.O., Vardi P., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Ya.* Cryostructuring of polymer systems. XXIX. Preparation and characterization of supermacroporous (spongy) agarose-based cryogels used as three-dimensional scaffolds for culturing insulin-producing cell aggregates. — *J. Appl. Polym. Sci.*, 2008, **108**, 3046.
103. *Bloch K., Vanichkin A., Damshkalin L.G., Lozinsky V.I., Vardi P.* Vascularization of wide pore agarose-gelatin cryogel scaffolds implanted subcutaneously in diabetic and non diabetic mice. — *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 1200.
104. *Евтюгин В.Г., Маргулис А.Б., Дамшкalin Л.Г., Лозинский В.И., Колпаков А.И., Ильинская О.Н.* Сорбция микроорганизмов крупнопористыми агарозными криогелями, содержащими привитые алифатические цепи различной длины. — *Микробиология*, 2009, **78**, 667.
105. *Лозинский В.И., Дамшкalin Л.Г., Плиева Ф.М., Галаев И.Ю., Маттиассон Б.* Полимерная композиция для получения макропористого агарозного геля и способ его получения. — Пат. РФ № 2220987 (2001); Б.И. № 1 (2004).
106. *Feller G.* Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures. — *J. Phys. Condens. Matter.*, 2010, **22(32)**, id 323101, doi: 10.1088/0953-8984/22/32/323101.
107. *Jahangiri E., Reichelt S., Thomas I., Hausmann K., Schlosser D., Schulze A.* Electron beam-induced immobilization of laccase on porous supports for waste water treatment applications. — *Molecules*, 2014, **19(8)**, 11860.
108. *Semashko T.A., Vorotnikova E.A., Sharikova V.F., Vinokurov K.S., Smirnova Y.A., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., Oppert B., Elpidina E.N., Filippova I.Y.* Selective chromogenic and fluorogenic peptide substrates for the assay of cysteine peptidases in complex mixtures. — *Anal. Biochem.*, 2014, **449**, 179.
109. *Семашко Т.А., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Бачева А.В., Филиппова И.Ю.* Химико-энзиматический синтез новых флуорогенных субстратов цистеиновых протеиназ семейства папаина. — *Биоорганическая химия*, 2008, **34(3)**, 376.

110. Hedström M., Plieva F., Galaev I. Yu., Mattiasson B. Monolithic macroporous albumin-chitosan cryogel structure: a new matrix for enzyme immobilization. — *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**(3), 907.
111. Gupta S., Ratna Prabha C., Murthy C.N. Functionalized multi-walled carbon nanotubes/polyvinyl alcohol membrane coated glassy carbon electrode for efficient enzyme immobilization and glucose sensing. — *J. Environ. Chem. Eng.*, 2016, **4**, 3734.
112. Uygun M., Akduman B., Ergönül B., Akta Uygun D., Akgöl S., Denizli A. Immobilization of amyloglucosidase onto macroporous cryogels for continuous glucose production from starch. — *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2015, **26**(16), 1112.
113. Guilherme E.P.X., de Oliveira J.P., de Carvalho L.M., Brandi I.V., Santos S.H.S., de Carvalho G.G.P., Cota J., de Carvalho B.M.A. Synthesis of supermacroporous cryogel for bioreactors continuous starch hydrolysis. — *Electrophoresis*, 2017, **38**(22-23), 2940.
114. Doan T., Bayram E., Uzun L., enel S., Denizli A. *Trametes versicolor* laccase immobilized poly(glycidyl methacrylate) based cryogels for phenol degradation from aqueous media. — *J. Appl. Polym. Sci.*, 2015, **132**, id 41981, doi: 10.1002/app.41981.
115. Olcer Z., Ozmen M.M., Sahin Z.M., Yilmaz F., Tanriseven A. Highly efficient method towards in situ immobilization of invertase using cryogelation. — *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, **171**(8), 2142.
116. Uygun M. Preparation of Laccase Immobilized Cryogels and Usage for Decolorization. — *J. Chem.*, 2013, id 387181, doi: 10.1155/2013/387181.
117. Лягин И.В., Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. Ферментные биосенсоры для определения пестицидов. — *Успехи химии*, 2017, **86**(4), 339.
118. Lindahl S., Liu J., Khan S., Karlsson E.N., Turner C. An on-line method for pressurized hot water extraction and enzymatic hydrolysis of quercetin glucosides from onions. — *Anal. Chim. Acta*, 2013, **785**, 50.
119. Petrov P., Pavlova S., Tsvetanov C.B., Topalova Y., Dimkov R. *In situ* entrapment of urease in cryogels of poly (*N*-isopropylacrylamide): An effective strategy for noncovalent immobilization of enzymes. — *J. Appl. Polym. Sci.*, 2011, **122**(3), 1742.
120. Petrov P., Jeleva D., Tsvetanov C.B. Encapsulation of urease in double-layered hydrogels of macroporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) core and poly(ethylene oxide) outer layer: fabrication and biosensing properties. — *Polym. Int.*, 2012, **61**(2), 235.
121. Türkmən D., Bereli N., Derazshamshir A., Perçin I., Shaikh H., Yilmaz F. Megaporous poly(hydroxy ethylmethacrylate) based poly(glycidylmethacrylate-*N*-methylacryloyl-(L)-tryptophan) embedded composite cryogel. — *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2015, **130**, 61.
122. Martínez Y.N., Cavello I., Hours R., Cavalitto S., Castro G.R. Immobilized keratinase and enrofloxacin loaded on pectin PVA cryogel patches for antimicrobial treatment. — *Bioresour. Technol.*, 2013, **145**, 280.
123. Nakagawa K., Tamura A., Chaiya C. Preparation of proteolytic microreactors by freeze-drying immobilization. — *Chem. Eng. Sci.*, 2014, **119**, 22.
124. Poraj-Kobielska M., Peter S., Leonhardt S., Ullrich R., Scheibner K., Hofrichter M. Immobilization of unspecific peroxygenases (EC 1.11.2.1) in PVA/PEG gel and hollow fiber modules. — *Biochem. Eng. J.*, 2015, **98**, 144.
125. Di Palma S., Hennrich M.L., Heck A.J., Mohammed S. Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. — *J. Proteomics*, 2012, **75**(13), 3791.
126. Bibi N.S., Gwara P.R., Soto Espinosa S.L., Grasselli M., Fernández-Lahore M. Synthesis and performance of 3DMegaporous structures for enzyme immobilization and protein capture. — *Biotechnol. Prog.*, 2011, **27**(5), 1329.

127. *Tao S.P., Zheng J., Sun Y.* Grafting zwitterionic polymer onto cryogel surface enhances protein retention in steric exclusion chromatography on cryogel monolith. — *J. Chromatogr. A*, 2015, **1389**, 104.
128. *Tao S.P., Wang C., Sun Y.* Coating of nanoparticles on cryogel surface and subsequent double-modification for enhanced ion-exchange capacity of protein. — *J. Chromatogr. A*, 2014, **1359**, 76.
129. *Bibi N.S., Fernández-Lahore M.* Grafted megaporous materials as ion-exchangers for bioproduct adsorption. — *Biotechnol. Prog.*, 2013, **29(2)**, 386.
130. *Alkan H., Bereli N., Baysal Z., Denizli A.* Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel. — *Biochem. Eng. J.*, 2009, **45(3)**, 201.
131. *Çakmak S., Gümüderehioğlu M., Denizli A.* Biofunctionalization of magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres with protein A: Characterization and cellular interactions. — *React. Funct. Polym.*, 2009, **69**, 586.
132. *Alkan H., Bereli N., Baysal Z., Denizli A.* Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly (hydroxyethyl methacrylate) cryogel. — *Biochem. Eng. J.*, 2009, **45(3)**, 201.
133. *Alkan H., Bereli N., Baysal Z., Denizli A.* Selective removal of the autoantibodies from rheumatoid arthritis patient plasma using protein A carrying affinity cryogels. — *Biochem. Eng. J.*, 2010, **51(3)**, 153.
134. *Bereli N., Ertürk G., Tümer M.A., Say R., Denizli A.* Oriented immobilized anti-hIgG via F(c) fragment-imprinted PHEMA cryogel for IgG purification. — *Biomed. Chromatogr.*, 2013, **27(5)**, 599.
135. *Bereli N., Andaç M., Baydemir G., Say R., Galaev I.Y., Denizli A.* Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels. — *J. Chromatogr. A*, 2008, **1190(1-2)**, 18.
136. *Qin L., He X.W., Zhang W., Li W.Y., Zhang Y.K.* Macroporous thermosensitive imprinted hydrogel for recognition of protein by metal coordinate interaction. — *Anal. Chem.*, 2009, **81(17)**, 7206.
137. *Bereli N., Saylan Y., Uzun L., Say R., Denizli A.* L-Histidine imprinted supermacroporous cryogels for protein recognition. — *Sep. Purif. Technol.*, 2011, **82**, 28.
138. *Gonçalves G.R.F., Gandolfi O.R.R., Santos L.S., Bonomo R.C.F., Veloso C.M., Verissimo L.A.A., Fontan R.D.C.I.* Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography. — *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2017, **1068–1069**, 71.
139. *Keçili R., Çelikolu U., Mil S., Ersöz A., Say R.* Concanavalin A photocross-linked affinity cryogels for the purification of horseradish peroxidase. — *Adsorpt. Sci. Technol.*, 2018, doi: 10.1177/0263617418760637.
140. *Uygun M., Uygun D.A., Özçalkın E., Akgöl S., Denizli A.* Concanavalin A immobilized poly (ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. — *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 2012, **887–888**, 73.
141. *Altunba C., Uygun M., Uygun D.A., Akgöl S., Denizli A.* Immobilization of inulinase on concanavalin A-attached super macroporous cryogel for production of high-fructose syrup. — *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, **170(8)**, 1909.
142. *Sun S., Tang Y., Fu Q., Liu X., Du W., Guo L., Zhao Y.* Preparation of agarose/chitosan composite supermacroporous monolithic cryogels for affinity purification of glycoproteins. — *J. Sep. Sci.*, 2012, **35(7)**, 893.

143. Efremenko E.N., Lyagin I.V., Plieva F.M., Galaev I.Y., Mattiasson B. Dried-reswollen immobilized biocatalysts for detoxification of organophosphorous compounds in the flow systems. — *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2009, **159**, 251.
144. Çetin K., Perçin I., Denizli F., Denizli A. Tentacle-type immobilized metal affinity cryogel for invertase purification from *Saccharomyces cerevisiae*. — *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2017, **45(7)**, 1431.
145. Çimen D., Türkmən D., Denizli A. Poly-(L)-histidine immobilized cryogels for lysozyme purification. — *Adsorpt. Sci. Technol.*, 2016, **34(7–8)**, 469.
146. Acet Ö., Baran T., Erdönmez D., Aksoy N.H., Alacabey ., Mente A., Odabai M. O-carboxymethyl chitosan Schiff base complexes as affinity ligands for immobilized metal-ion affinity chromatography of lysozyme. — *J. Chromatogr. A*, 2018, doi: 10.1016/j.chroma.2018.03.022.
147. Tüzmen N., Kalburcu T., Denizli A. Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. — *Process Biochem.*, 2012, **47(1)**, 26.
148. Baran N.Y., Acet Ö., Odabai M. Efficient adsorption of hemoglobin from aqueous solutions by hybrid monolithic cryogel column. — *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2017, **73**, 15.
149. Ünlü N., Ceylan ., Erzençin M., Odabai M. Investigation of protein adsorption performance of Ni<sup>2+</sup>-attached diatomite particles embedded in composite monolithic cryogels. — *J. Sep. Sci.*, 2011, **34(16–17)**, 2173.
150. Cömert S.C., Odabai M. Investigation of lysozyme adsorption performance of Cu<sup>2+</sup>-attached PHEMA beads embedded cryogel membranes. — *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2014, **34**, 1.
151. Uygun A., Uygun M., Akgöl S., Denizli A. Reversible adsorption of catalase onto Fe<sup>3+</sup> chelated poly(AAm-GMA)-IDA cryogels. — *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2015, **50**, 379.
152. Uygun D.A., Akduman B., Uygun M., Akgöl S., Denizli A. Immobilization of alcohol dehydrogenase onto metal-chelated cryogels. — *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2015, **26(7)**, 446.
153. Khaparde A., Vijayalakshmi M.A., Tetala K.K.R. Development of a metal/chelate poly-hydroxyethylmethacrylate monolith capillary for selective depletion of immunoglobulin G from human plasma for proteomics. — *J. Chromatogr. A*, 2017, **1517**, 117.
154. Uygun M., Akduman B., Akgöl S., Denizli A. A new metal-chelated cryogel for reversible immobilization of urease. — *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, **170(8)**, 1815.
155. Uygun M., Yavaer R., Uygun D.A. Reversible papain immobilization onto poly(AAm-MMA)-based cryogels. — *Bull. Mater. Sci.*, 2016, **39(4)**, 1039.
156. Uygun M. Dye-attached cryogels for reversible alcohol dehydrogenase immobilization. — *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2014, **959**, 42.
157. Perçin I., Sener G., Demirçelik A.H., Bereli N., Denizli A. Comparison of two different reactive dye immobilized poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel discs for purification of lysozyme. — *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, **175(6)**, 2795.
158. Uygun M., Akduman B., Uygun D.A., Akgöl S., Denizli A. Dye functionalized cryogel columns for reversible lysozyme adsorption. — *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2015, **26(5)**, 277.
159. Efremenko E., Senko O., Zubaerova D., Podorozhko E., Lozynsky V. New biocatalyst with multiple enzymatic activities for treatment of food industry wastewaters. — *Food Technol. Biotechnol.*, 2008, **46(2)**, 208.
160. Partovinia A., Naeimpoor F. Comparison of phenanthrene biodegradation by free and immobilized cell systems: formation of hydroxylated compounds. — *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2014, **21(9)**, 5889.



161. da Cunha M.A.A., Converti A., Santos J.C., Ferreira S.T.S., da Silva S.S. PVA-hydrogel entrapped *Candida guilliermondii* for xylitol production from sugarcane hemicellulose hydrolysate. — Appl. Biochem. Biotechnol., 2009, **157**, 527.
162. Börner R.A., Zaushitsyna O., Berillo D., Scaccia N., Mattiasson B., Kirsebom H Immobilization of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 as macroporous aggregates through cryogelation for butanol production. — Process Biochem., 2014, **49**, 10.
163. Efremenko E.N., Nikolskaya A.B., Lyagin I.V., Senko O.V., Makhlis T.A., Stepanov N.A., Maslova O.V., Mamedova F., Varfolomeev S.D. Production of biofuels from pretreated microalgae biomass by anaerobic fermentation with immobilized *Clostridium acetobutylicum* cells. — Bioresour. Technol., 2012, **114**, 342.
164. Tripathi A., Sami H., Jain S.R., Vilorio-Cols M., Zhuravleva N., Nilsson G., Jungvid H., Kumar A. Improved bio-catalytic conversion by novel immobilization process using cryogel beads to increase solvent production. — Enzyme Microb. Technol., 2010, **47**, 44.
165. Андрюшина В.А., Карпова Н.В., Дружинина А.В., Стъценко Т.С., Подорожко Е.А., Рябов А.Н., Лозинский В.И. Новый иммобилизованный биокатализатор для микробиологического синтеза фармацевтических стероидов. — Прикл. биохим. микробиол., 2015, **51(5)**, 472.
166. Al-Zuhair S., El-Naas M. Immobilization of *Pseudomonas putida* in PVA gel particles for the biodegradation of phenol at high concentrations. — Biochem. Eng. J., 2011, **56**, 46.
167. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Kamenskikh T.N., Bulicheva M.V., Stukova G.I. Survival of cryogel-immobilized *Rhodococcus* strains in crude oil-contaminated soil and their impact on biodegradation efficiency. — Int. Biodeterior. Biodegrad., 2013, **84**, 118.
168. Kylosova T.I., Elkin A.A., Grishko V.V., Ivshina I.B. Biotransformation of prochiral sulfides into (R)-sulfoxides using immobilized *Gordonia terrae* IEGM 136 cells. — J. Mol. Catal. B-Enzym., 2016, **123**, 8.
169. Magrí A., Vanotti M.B., Szögi A.A. Anammox sludge immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) cryogel carriers. — Bioresour. Technol., 2012, **114**, 231.
170. Surkatti R., El-Naas M.H. Competitive interference during the biodegradation of cresols. — Int. J. Environ. Sci. Technol., 2018, **15**, 301.
171. Christova N., Petrov P., Kabaivanova L. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BN10 cells entrapped in cryogels. — Z. Naturforsch. C, 2013, **68**, 47.
172. Hristov A.E., Chistova N.E., Kabainova L.V., Nacheva L.V., Stoineva I.B., Petrov P.D. Simultaneous biodegradation of phenol and n-hexadecane by cryogel immobilized biosurfactant producing strain *Rhodococcus wratislawiensis* BN38. — Polish J. Microbiol., 2016, **65**, 287.
173. Dzhakasheva M.A., Esimova A.M., Elemanova Z.R., Tasybaeva S.B., Narymbaeva Z.K. Immobilized biocatalyst for production of red table wines. — J. Pharm. Sci. Res., 2017, **9**, 751.
174. Alenina K.A., Aleskerova L.E., Kascheyeva P.B., Ismailov A.D. The poly(vinyl alcohol)-immobilized photobacteria for toxicology monitoring. — Engineering, 2012, **5**, 118.
175. Stepanov N., Efremenko E. "Deceived" concentrated immobilized cells as biocatalyst for intensive bacterial cellulose production from various sources. — Catalysts, 2018, **8(1)**, id 33, doi:10.3390/catal8010033.
176. Dotsenko A.S., Dotsenko G.S., Senko O.V., Stepanov N.A., Lyagin I.V., Efremenko E.N., Gusakov A.V., Zorov I.N., Rubtsova E.A. Complex effect of lignocellulosic biomass pretreatment with 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid on various aspects of ethanol and fumaric acid production by immobilized cells within SSF. — Bioresour. Technol., 2018, **250**, 429.
177. Stepanov N.A., Senko O.V., Efremenko E.N. Biocatalytic production of the extracellular exopolysaccharide dextran, synthesized by cells of *Leuconostoc mesenteroides*. — Catal. Ind., 2017, **9**, 339.

178. Senko O.V., Efremenko E.N. Highly concentrated populations of *Aureobasidium pullulans* cells in the biocatalytic processes of pullulan production. — Catal. Ind., 2017, 9, 344.
179. Stepanov N., Efremenko E. Immobilised cells of *Pachysolen tannophilus* yeast for ethanol production from crude glycerol. — New Biotech., 2017, 34, 54.
180. Maslova O.V., Senko O.V., Stepanov N.A., Efremenko E.N. Lactic acid production using free cells of bacteria and filamentous fungi and cells immobilized in polyvinyl alcohol cryogel: a comparative analysis of the characteristics of biocatalysts and processes. — Catal. Ind., 2016, 8, 280.
181. Степанов Н.А., Ефременко Е.Н. Биокаталитическое получение альгината, продуцируемого клетками *Azotobacter vinelandii* в иммобилизованной форме. — Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова, 2017, 13, 25.
182. Efremenko E.N., Stepanov N.A., Gudkov D.A., Senko O.V., Lozinsky V.I., Varfolomeev S.D. Immobilized fungal biocatalysts for the production of cellulase complex hydrolyzing renewable plant feedstock. — Catal. Ind., 2013, 5, 190.
183. Никольская А.Б., Холстов А.В., Лягин И.В., Мамедова Ф., Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. Иммобилизованные клетки *Chlorella vulgaris* для решения задач альтернативной энергетики и экологии. — Альтернативная энергетика и экология, 2012, 4(108), 95.
184. Ефременко Е.Н., Холстов А.В., Воронова Е.Н., Конюхов И.В., Погосян С.И., Рубин А.Б. Биосенсор на основе клеток микроводорослей для определения тяжелых металлов и гербицидов в водных системах. — Пат. РФ № 2426779 (2009), Б.И. № 23 (2011)
185. Разумовский С.Д., Ефременко Е.Н., Махлис Т.А., Сенько О.В., Быховский М.Я., Подмастерьев В.В., Варфоломеев С.Д. Влияние иммобилизации на основные динамические характеристики реакции ферментативного окисления метана в метанол бактериями рода *Methylosinus sporium* В-2121. — Известия АН, сер. хим., 2008, 8, 1603.
186. Ефременко Е.Н., Садраддинова Э.Р., Зотова Н.А., Нетрусов А.И. Биокатализатор на основе иммобилизованных клеток фототрофных бактерий для получения водорода. — Пат. РФ № 2323975 (2006), Б.И. № 13(2008).
187. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Сенько О.В., Лобастов С.Л., Лягин И.В., Аксенов А.В., Варфоломеев С.Д. Биокатализатор на основе иммобилизованных клеток бактерий для разложения метилфосфоновой кислоты. — Пат. РФ № 2360967 (2007), Б.И. №19 (2009).
188. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Лягин И.В., Сенько О.В., Гудков Д.А., Аксенов А.В., Степанов Н.А., Сироткина М.С., Спиричева О.В., Иванов Р.В., Лозинский В.И., Варфоломеев С.Д., Кондратьев В.Б., Холстов В.И. Способ биоразложения фосфорорганических соединений в составе реакционных масс, получаемых после химического уничтожения вещества типа Vx. — Пат. РФ № 2408724 (2009), Б.И. №1 (2011).
189. Филимонов И.В., Янковская А.А., Завьялова Н.В., Голтад А.Н., Колесников Д.П., Ковтун В.А., Холстов В.И., Ефременко Е.Н. Биотехнологические методы деструкции отравляющих веществ и продуктов их детоксикации. — Вестник войск РХБ защиты, 2017, 1, 4.
190. Kumar J., Karande A.A., Kumar A. Combined effect of cryogel matrix and temperature-reversible soluble-insoluble polymer for the development of in vitro human liver tissue. — ACS Appl. Mater. Interfaces, 2016, 8, 264.
191. Jain E., Kumar A. Disposable polymeric cryogel bioreactor matrix for therapeutic protein production. — Nat. Protoc., 2013, 8, 821.

192. Shirbin S.J., Karimi F., Chan N.J.-A., Heath D.E., Qiao G.G. Macroporous hydrogels composed entirely of synthetic polypeptides: biocompatible and enzyme biodegradable 3D cellular scaffolds. — *Biomacromolecules*, 2016, **17**, 2981.
193. Bencherif S.A., Sands R.W., Bhatta D., Arany P., Verbeke C.S., Edwards D.A., Mooney D.J. Injectable preformed scaffolds with shape-memory properties. — *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, **109(48)**, 19590.
194. Ефременко Е.Н., Татарнинова Н.Ю. Влияние длительного хранения клеток микроорганизмов, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта, на их выживаемость и биосинтез целевых метаболитов. — *Микробиология*, 2007, **76(3)**, 383.
195. Варфоломеев С.Д., Гуревич Г.К. БиокINETика. Практический курс. — М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999, 720 с.
196. Мамедова Ф.Т. Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и к процессам ее биокаталитической трансформации. — Автореферат дисс. канд. хим. наук, М.: МГУ имени М.В. Ломоносова, 2015. — 23 с.
197. Ефременко Е.Н., Сенько О.В., Алексерова Л.Э., Аленина К.А., Мажуль М.М., Исмаилов А.Д. Биосенсоры на основе иммобилизованных в криогель поливинилового спирта светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* для биомониторинга экотоксикантов. — *Прикл. биохим. микробиол.*, 2014, **50**, 460.
198. Dong X.-Y., Bai S., Sun Y. Production of L(+)-lactic acid with *Rhizopus oryzae* immobilized in polyurethane foam cubes. — *Biotechnol. Lett.*, 1996, **18 (2)**, 225.
199. Луста К.А., Горкина Н.Б., Шульга А.В., Фухте Б.А. Иммобилизация мицелиальных грибов, продуцирующих полисахаразы, в криополиакриламидном геле. — *Прикл. биохим. микробиол.*, 1990, **26**, 492.
200. Wolken W.A.M., Tramper J., Werf M.J. What can spores do for us? — *Trends Biotechnol.*, 2003, **21(8)**, 338.
201. Polymeric Cryogels: Macroporous Gels with Remarkable Properties. *Advances in Polymer Science*, vol 263 / edited by Okay O. — Cham, Switzerland: Springer, 2014. — 330 p.
202. Zhan X.-Y., Lu D.-P., Lin D.-Q., Yao S.-J. Preparation and characterization of supermacroporous polyacrylamide cryogel beads for biotechnological application. — *J. Appl. Polym. Sci.*, 2013, **130(5)**, 3082.
203. Подорожко Е.А., Лунев И.А., Рябев А.Н., Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 39. Композитные криогели поливинилового спирта, наполненные микрочастицами хитозана. — *Коллоидный журнал*, 2015, **77(2)**, 197.
204. Khaparde A., Vijayalakshmi M.A., Tetala K.K.R. Preparation and characterization of a Cu(II)-IDA poly HEMA monolith syringe for proteomic applications. — *Electrophoresis*, 2017, **38(22-23)**, 2981.

## Глава 7

# Низкотемпературные методы получения нано- и биоматериалов

*Шляхтин О.А.<sup>1</sup>, Лозинский В.И.<sup>2</sup>*

Синтез неорганических нано- и биоматериалов является одним из перспективных, востребованных и быстро развивающихся направлений современного материаловедения. Большинство существующих методов их получения основано на использовании водных растворов, содержащих необходимые катионы, как правило, в соотношении, соответствующем стехиометрии синтезируемого материала. Необходимым условием получения таких неорганических наноматериалов из водных растворов является высокая степень удаления от термодинамического равновесия при протекании химических и физических процессов, используемых при синтезе. Это является необходимым условием предотвращения процессов роста образующихся частиц за счет резкого сокращения продолжительности процессов, а также сохранения высокой химической однородности при синтезе многокомпонентных материалов.

Высокая степень отклонения от равновесия при переходе прекурсоров из жидкого состояния в твердое может достигаться как химическими, так и физическими методами. Наиболее распространенным и известным способом получения оксидных наноматериалов является метод химического осаждения (соосаждения), при котором водный раствор компонентов прекурсора вводится в раствор осадителя, обычно при значительном избытке последнего. За счет высокой скорости протекания процессов осаждения и малой растворимости их продуктов, препятствующей росту кристаллитов осадка, образующиеся частицы, как правило, наноразмерны. При впрыскивании микрокапель исходного раствора в поток горячего воздуха или плазмы, что реализуется в методах пиролиза аэрозолей и плазмохимического синтеза, наноразмер твердых частиц обеспечивается как высокой скоростью испарения растворителя, так и уменьшением размера частиц при пиролизе за счет значительного различия удельных мольных объемов исходной соли и оксида — продукта реакции.

---

<sup>1</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова

Высокая степень отклонения от равновесия может достигаться и при быстром охлаждении исходного раствора, сопровождающемся его переходом в аморфное или кристаллическое твердое состояние. Для сохранения высокой химической однородности продукта замораживания и возможности его использования при комнатной температуре из него необходимо удалить растворитель при минимальном влиянии на солевой компонент прекурсора, для чего обычно используется сублимационная сушка. Эффективным оказалось и использование низкотемпературных процессов в сочетании с другими неравновесными методами синтеза, в частности с методом соосаждения. Различные варианты применения низкотемпературных процессов и методов при синтезе современных неорганических наноматериалов и некоторых видов биоматериалов будут рассмотрены в настоящей главе.

## 7.1. Синтез наноматериалов из замороженных растворов

Впервые синтез наноматериалов из замороженных водных растворов описан в одной из первых публикаций по криохимическому синтезу неорганических материалов [1]. Для использования в порошковой металлургии авторам необходимо было получить высокодисперсные порошки вольфрама и сплава вольфрама и рения, температура плавления которых превышает 3000 °С [2]. Для этого водный раствор вольфрамата и перрената аммония замораживали в жидком азоте, при этом авторы отмечали практическую важность замораживания с максимально возможной скоростью. Полученный продукт подвергали сублимационной сушке в лабораторном сублиматоре при давлении 0.1 мбар. Восстановление продуктов сушки водородом при температурах от 200 до 700 °С привело к получению порошков металлов и сплавов с размером кристаллитов 20–30 нм, значения которого хорошо совпадали как для рентгеновских методов анализа, так и для расчетов по данным измерения удельной поверхности.

Основным направлением использования криохимических методов при синтезе неорганических материалов является получение различных, прежде всего многокомпонентных оксидных материалов. Многочисленные работы в этой области, для развития которой имели большое значение работы научной школы акад. Ю.Д. Третьякова, описаны в ряде обзоров и монографий [3–8]. Основным отличием схемы синтеза, использованной в большинстве этих работ, от последовательности операций, описанной в работе [1], является термическое разложение продуктов сублимационного обезвоживания не в восстановительной или инертной среде, а на воз-

духе. При этом следует отметить, что размер кристаллитов солей, образующихся при замораживании их водных растворов распылением в жидкий азот и практически не изменяющих своих размером в ходе сублимационной сушки, обычно составляет несколько сотен нанометров [9]. Лишь путем применения специальных методов этот размер удастся уменьшить до нескольких десятков нанометров [10, 11]. Термическое разложение солевых прекурсоров, обычно осуществляемое при температурах свыше 600 °С, также приводит к получению порошков простых и сложных оксидов с размерами кристаллитов более 100 нм.

Поскольку предметом обзора являются прежде всего неорганические материалы с размером кристаллитов меньше 100 нм, мы рассмотрим лишь некоторые варианты использования классической схемы криохимического синтеза, приводящие к получению наноматериалов. Этого можно добиться, в частности, используя в качестве исходных растворы, одни компоненты которых обладают окислительными, а другие — восстановительными свойствами. Такое сочетание приводит к интенсивному протеканию процессов термического разложения сублимированных прекурсоров при относительно низких температурах (300–400 °С) и соответствующему снижению размеров кристаллитов оксидных продуктов термоллиза до 100 нм и менее.

Такое возможно, в частности, при сочетании низкотемпературных методов, характерных для криохимического синтеза из растворов — криокристаллизации и сублимационной сушки, — с методами иммобилизации солевых компонентов прекурсора, характерными для другого химического метода синтеза наноматериалов — полимер-гель метода, наиболее распространенная версия которого известна как метод Печини [12]. При этом к водному раствору нитратов компонентов, взятых в стехиометрическом соотношении, добавляются лимонная кислота и этиленгликоль [13, 14]. Вместо нитратов в некоторых случаях успешно использовали ацетаты [15, 16], а в качестве комплексообразователя вместо лимонной кислоты использовалась ЭДТА [17]. Наибольшие же различия в исходных реагентах, использованных различными группами, наблюдаются в гелеобразующих агентах. Наряду с продуктами поликонденсации этиленгликоля и лимонной кислоты, для этого могут быть использованы также триблок-сополимер P-123 [18], пропиленгликоль, модифицированный силаном [15], агароза, желатин, поливиниловый спирт [16] и даже крахмал [19, 20].

При использовании низкотемпературной версии полимер-гель метода быстрое охлаждение исходного раствора, содержащего водорастворимый полимер, приводит к образованию полимерного геля, трехмерный каркас которого достаточно прочен и почти не изменяется в ходе сублимационной сушки. Водный раствор неорганических компонентов, часто склонных

к аморфизации при быстром замораживании, замерзает внутри этого каркаса, который не позволяет фрагментам замороженного раствора объединиться даже при сушке при температурах выше температуры стеклования, в прочих случаях приводящей к коллапсу и плавлению аморфных продуктов криокристаллизации. В результате этого продукт сублимационной сушки остается твердым вне зависимости от анионного состава исходного раствора, что существенно облегчает последующие операции с ним.

Как уже отмечалось, анионный состав исходного раствора во многих случаях выбирается таким образом, чтобы способствовать интенсивному протеканию окислительно-восстановительных реакций при термическом разложении продуктов сублимации. Это, как правило, приводит к значительному снижению температуры окончания термолиза и способствует протеканию твердофазных реакций между компонентами прекурсора, приводящих к образованию многокомпонентных оксидных соединений.

Интенсивное протекание реакций внутреннего окисления-восстановления и обусловленное этим совмещение во времени отдельных стадий термолиза способствуют образованию высших членов гомологических рядов оксидных соединений. В этом случае простые промежуточные продукты термолиза прекурсоров и первые члены гомологических рядов, образование которых кинетически предпочтительно, не теряют своей активности. Последнее часто наблюдается при малых скоростях нагрева, способствующих последовательному протеканию стадий термолиза, часто со значительными интервалами между ними, что существенно осложняет завершение твердофазных реакций формирования сложных многокомпонентных продуктов синтеза, которое в этом случае часто требует дополнительного изотермического отжига при повышенных температурах.

Использование низких температур в полимер-гель синтезе позволяет в значительной мере компенсировать и один из главных недостатков классического метода синтеза по схеме Печини, связанный с недостаточной макрокинетической воспроизводимостью процессов термического разложения полимер-гель прекурсоров. Большие различия удельных мольных объемов прекурсоров и конечных продуктов их термолиза приводят к значительному уменьшению размеров оксидных кристаллитов, в то время как сравнительно невысокие температуры и малая продолжительность процессов флэш-термолиза практически исключают возможность их роста в ходе термообработки.

Оба этих фактора делают низкотемпературные варианты полимер-гель метода удобными и эффективными приемами получения нанокристаллических индивидуальных оксидов, их твердых растворов и многокомпонентных оксидных соединений (рис. 7.1). К определенным недостаткам продуктов такого метода синтеза можно отнести лишь довольно высокую

степень агрегации кристаллитов, характерную, впрочем, и для многих других химических методов их синтеза.

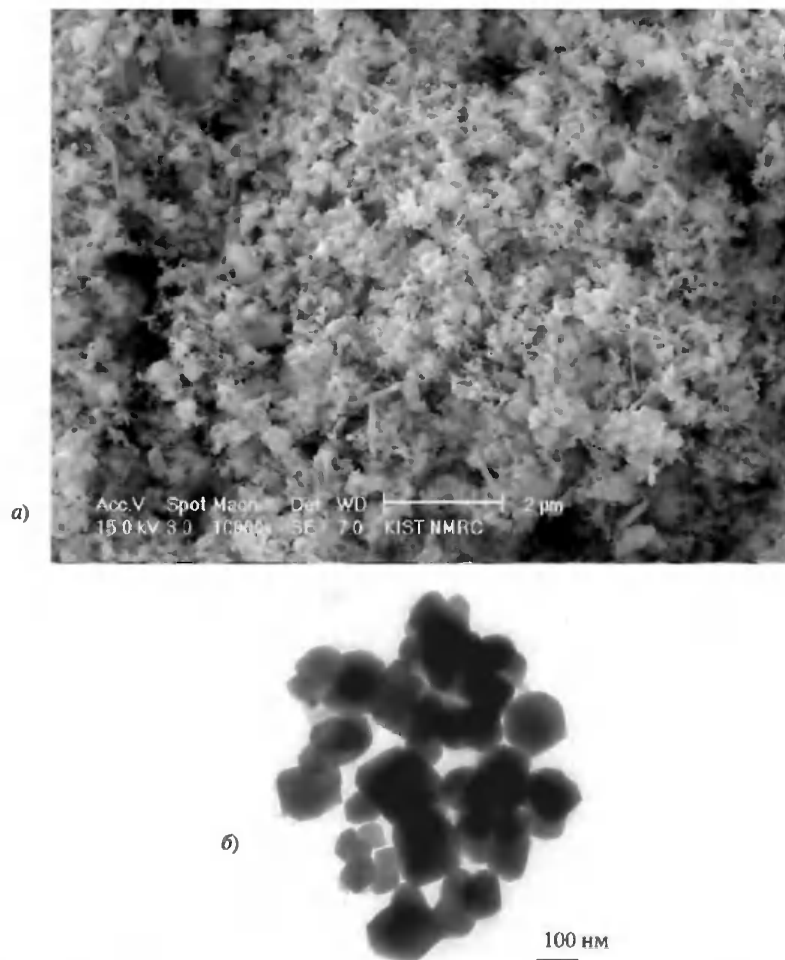


Рис. 7.1. Микрофотографии ультрадисперсных порошков LaNa-манганитов, полученные методом сканирующей (а) и просвечивающей (б) электронной микроскопии



## 7.2. Криотропное гелеобразование в золях неорганических веществ

Структурирующее действие замораживания на гидратированные золи гидроксидов слабых неорганических оснований (например, гидроксиды железа) известно довольно давно [21–26]. Превращение таких золь в гели протекает по поликонденсационному механизму с выделением воды и образованием трехмерной сетки неорганического оксида. Аналогичным образом формируется силикагель при старении золя кремниевой кислоты [27, 28], поэтому криогенный вариант этого процесса можно рассматривать как поликонденсационное криотропное гелеобразование, т. е. формирование трехмерной сетки неорганического полимера именно в замороженной среде. При этом замораживание системы, выделяющей в ходе химической реакции воду, т. е. принудительная дегидратация неорганического полимера, должно сдвигать равновесие в сторону конечного продукта. В экспериментальном плане получение криосиликагеля требует весьма аккуратного подтитрования кислотой щелочного раствора силиката при охлаждении до момента образования кремнезоля. Далее коллоидную систему необходимо быстро заморозить, чтобы собственно реакция поликонденсации (т. е. старение золя) в основном протекала именно в незамерзшей жидкой микрофазе [29] макроскопически замороженного препарата.

Интересной особенностью процесса формирования криосиликагеля является то, что после оттаивания неорганический гель получается не в виде блока, а как достаточно одинаковые по размерам (2–5 мм – в зависимости от температуры криогенной обработки) чешуйкоподобные частицы [30]. Это – следствие хрупкости криосиликагеля, фрагментируемого растущими поликристаллами льда. В случае же получения эластичных криогелей на основе органических полимеров подобной дезинтеграции образцов практически никогда не наблюдается [31, 32]. Структура криосиликагелей и их свойства главным образом определяются концентрацией реагентов и температурой замораживания. В частности, при исходной концентрации силиката выше 0,5 М удельные поверхности обычного силикагеля и криосиликагелей, сформированных при  $-10$ ,  $-20$  или  $-30$  °С, почти не отличаются. Однако криогенная обработка менее концентрированных систем приводит к криосиликагелям с удельной поверхностью большей, чем у обычного силикагеля, полученного из такой же реакционной массы, но при положительной температуре. При этом криосиликагели, сформированные при  $-10$  °С, обладают большей удельной поверхностью, чем образцы, полученные при  $-20$  и  $-30$  °С [33]. К сожалению, экспериментальных

данных по исследованию подобного рода неорганических криогелей пока недостаточно для корректного объяснения этой тенденции.

Показано, что криосиликагели могут служить операционно стабильными носителями иммобилизованных клеток микроорганизмов при работе таких биокаталитических систем в реакторах с протоком газовой среды [30]. В силу специфических условий подобных процессов, например при окислении водорода иммобилизованными в криосиликагель клетками, мягкие полимерные гелевые носители даже при высокой влажности газовой фазы быстро пересыхают и коллапсируют, поэтому требуется жесткий высокопористый материал, объем которого не изменяется при функционировании в подобной проточной системе. Это требование к носителю иммобилизованных клеток обеспечивается механической прочностью криосиликагеля, а его макропористая структура способствует незатрудненному подводу газообразного субстрата, т. е. малорастворимого в воде водорода, к клеткам, находящимся в объеме макропор.

Интересный пример получения криосиликагеля приведен в работе [34], когда формирование микронных частиц неорганической фазы происходило в результате гидролитической поликонденсации тетраметоксисилана, введенного непосредственно перед замораживанием в водный раствор поливинилового спирта (ПВС). После оттаивания системы получался композитный органическо-неорганический (так называемый «гибридный») криогель, обладавший существенно более высокой жесткостью и теплостойкостью по сравнению с эквикоцентрированным по полимеру криогелем ПВС без добавок. Таким образом, сочетание в одном материале фаз органического и неорганического криогелей приводило к значительному повышению физических показателей конечного продукта.

В заключение раздела необходимо отметить, что такие криогенно-структурированные материалы, как неорганические криогели, т. е. сольватированные неорганические трехмерные сетки, образование узлов которых происходило в замороженных средах, до сих пор являются слабо изученными объектами.

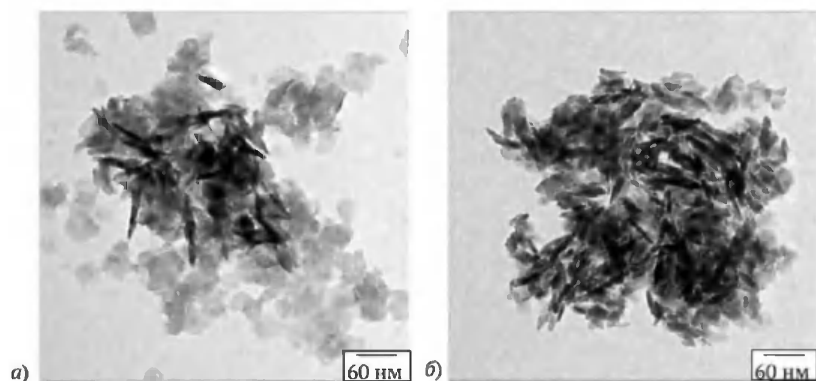
### **7.3. Сублимационная сушка продуктов гидролиза, осаждения и соосаждения**

Как отмечалось ранее, весьма эффективным и распространенным вариантом использования низкотемпературных методов для получения неорганических наноматериалов из водных растворов является их сочетание с процессами химического осаждения, при которых высокая степень неравновесности перехода компонентов из жидкой фазы в твердую обеспечи-

вается прежде всего химическими методами. Для этого водный раствор, содержащий необходимые катионы в соотношении, соответствующем стехиометрии конечного оксидного продукта, смешивают с водным раствором реагента, образующего с этими катионами малорастворимые соединения — обычно гидроксиды, карбонаты или оксалаты.

Произведения растворимости продуктов осаждения различных катионов, входящих в состав многокомпонентного материала, часто значительно отличаются. Кроме того, скорость образования частиц твердой фазы этих продуктов при осаждении также может быть весьма различной. Поскольку процесс осаждения протекает не мгновенно, в результате этих различий первые и последние порции продуктов соосаждения часто бывают обогащены разными катионами исходного раствора. Возможность существования такой неоднородности допускалась многими авторами, однако доказать экспериментально неоднородность нанокристаллического продукта соосаждения удалось только в 2000-х [35]. Как правило, термическое разложение продуктов соосаждения используется для синтеза многокомпонентных оксидных соединений. Опыт использования таких прекурсоров для синтеза различных материалов показывает, что описанная выше химическая неоднородность осадков на наноуровне не оказывает значимого воздействия на скорость протекания твердофазных реакций синтеза конечных продуктов при термообработке продуктов соосаждения, что во многом способствовало широкому применению этого метода при синтезе многих современных материалов. Относительно низкие температуры такого синтеза, сопоставимые с упоминавшимися ранее температурами термического разложения полимерных криогелей, обеспечивают малый размер кристаллитов продуктов термолиза соосажденных прекурсоров, часто находящийся в наноразмерном диапазоне (рис. 7.2).

Одним из недостатков метода синтеза наноматериалов из продуктов соосаждения является образование достаточно прочных контактов между первичными кристаллитами в ходе сушки полученных осадков при атмосферном давлении, особенно при повышенных температурах. Их сохранение между отдельными частицами при последующем термолизе, особенно характерное для термолиза гидроксидов, для которых разница удельных мольных объемов прекурсора и конечного продукта невелика, приводит к значительной агломерации оксидных порошков — продуктов синтеза. Кроме того, капиллярные эффекты при сушке осадков при атмосферном давлении приводят к значительному уплотнению осадка, прежде всего за счет исчезновения крупных пор. Происходящее при этом уплотнении уменьшение расстояния между соседними частицами способствует протеканию процессов роста кристаллитов при последующем термолизе, затрудняя получение нанокристаллических продуктов реакции.



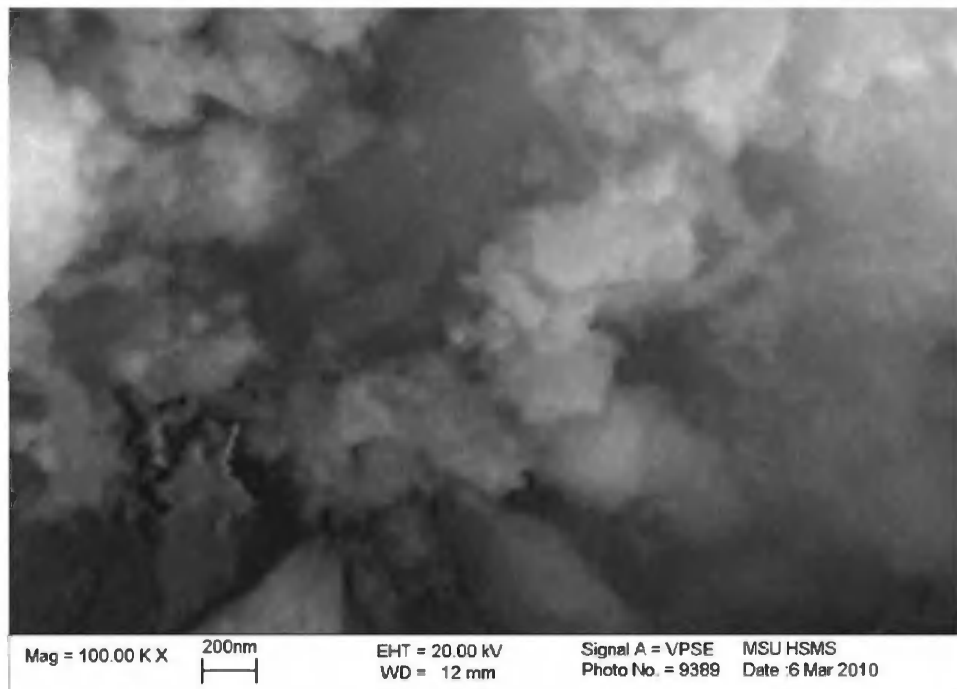
**Рис. 7.2.** Микрофотографии продукта сублимационного обезвоживания смешанного Ni-Mn гидроксида (а) и продукта его термообработки при 400 °С (б), полученные методом просвечивающей электронной микроскопии

Устранению этих недостатков во многом способствует использование сублимационной сушки замороженных осадков, при котором образование прочных контактов между частицами осадка практически исключено. Простота и эффективность этого приема сделали его весьма популярным при получении самых различных наноматериалов. При синтезе твердых растворов на основе индивидуальных оксидов [36–39] и многокомпонентных оксидных соединений (рис. 7.3) [40–49] высокая химическая гомогенность таких прекурсоров способствует быстрому и достаточно равномерному по объему протеканию процессов синтеза конечных соединений при термическом разложении прекурсоров и последующей термообработке.

Даже в тех случаях, когда компоненты синтезируемого материала не взаимодействуют между собой, как, например, при синтезе нанокompозитов, высокая химическая однородность прекурсора оказывается полезной для обеспечения высокой пространственной однородности распределения компонентов в конечном продукте синтеза и высокой степени контакта частиц компонентов между собой [50–65]. Последовательное осаждение компонентов с последующим замораживанием и сублимационной сушкой позволяет получать нанокompозиты типа «ядро-оболочка» [66].

Особенности продуктов сублимационного обезвоживания оказываются полезными при синтезе твердых катализаторов различных жидкофазных и газофазных процессов. Относительно низкая термическая стабильность оксидов серебра и благородных металлов дает возможность в одном и том же синтезе получать многофазные композиты, включающие не только сам катализатор, но и оксидные компоненты — активаторы, промоторы, носители. В этом случае исходный гель или осадок должен содержать гидроксиды всех необходимых компонентов. Термообработка продуктов

сублимационной сушки таких гелей при  $T = 600\text{--}1300\text{ }^\circ\text{C}$  приводит к разложению гидроксидов алюминия, титана и циркония до соответствующих оксидов, а аналогичных соединений серебра [67–69], платины и палладия [70–72] — до металлов. Введение углеродных наноматериалов в раствор соли благородного металла с ее последующим восстановлением до металла при помощи  $\text{NaBH}_4$  или этиленгликоля, дальнейшим замораживанием и сублимационной сушкой полученной суспензии позволяет получать платино-никелевые и платино-родиевые катализаторы на углеродных носителях без дополнительной термообработки [73–75]. Подобные же синтетические приемы могут использоваться при синтезе устойчивого без носителя электрокатализатора на основе наночастиц платины и золота [76], а также для формирования квантовых точек  $\text{CdTe}$  в межплоскостном пространстве монтмориллонита [65].

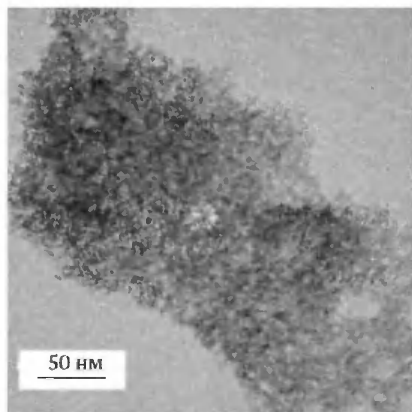


**Рис. 7.3.** Микрофотография порошка иттрий-алюминиевого граната  $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ , полученного из соосажденных прекурсоров, подвергнутых замораживанию и сублимационной сушке

Управление условиями термического разложения позволяет модифицировать микроморфологию частиц, формирующихся при пиролизе, таким образом, чтобы обеспечить формирование высокоплотной функциональной керамики при минимальных температурах спекания [77–79]. От-

существование прочных агломератов оказывается крайне важным при получении плотной, оптически прозрачной керамики [41], которая может использоваться в качестве рабочего тела твердотельных лазеров [80–82]. Продукты сублимационной сушки осадков могут использоваться также в качестве темплатов в топомехимических реакциях с участием легкоплавких компонентов. В тех случаях, когда лимитирующей стадией реакции фазообразования конечного продукта является диффузия подвижного компонента в частицу прекурсора, размер и форма частиц конечного продукта могут задаваться путем контроля соответствующих параметров частиц темплата-прекурсора [83–85].

Сублимационная сушка осадков и суспензий применяется и при синтезе однокомпонентных наноматериалов. Поскольку в этом случае нет необходимости сохранять химическую гомогенность прекурсора, основной задачей, которая решается таким способом, является сохранение при сушке специфической морфологии частиц осадков  $\text{Co}_3\text{O}_4$  [18],  $\text{CeO}_2$  [86],  $\text{V}_2\text{O}_5$  [87], and  $\text{ZrO}_2$  [88]. Продукты сублимационной сушки гелей кремнекислоты, которые, согласно классификации, приведенной в главе 3 данной книги, относятся к криоструктурам, активно используются как сорбенты [89–96] и теплоизолирующие материалы для низких температур [7, 8]. В этом случае наиболее важной особенностью геля, которую помогает сохранить сублимационная сушка, является его уникальная мезопористая структура (рис. 7.4). Криоструктуры  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , напротив, отличаются достаточно высокой стабильностью при высоких температурах, благодаря чему используются в качестве носителей катализаторов химических реакций, протекающих при высоких температурах [97, 98].



**Рис. 7.4.** Каркасные пористые материалы на основе  $\text{SiO}_2$ , полученные замораживанием и сублимационной сушкой органогелей. Микрофотографии получены методом просвечивающей электронной микроскопии

Растущее количество исследований в области фотовольтаики привлекло внимание ряда авторов к наноматериалам на основе продуктов субли-

мационной сушки осадков  $\text{TiO}_2$ . Наряду с гидролизом  $\text{TiCl}_4$  и алкоголятов титана [99, 100], гидрогели  $\text{TiO}_2$  могут быть получены селективным травлением  $\text{BaTiO}_3$  минеральными кислотами [101, 102]. Правильный выбор условий травления может привести к получению различных полиморфных модификаций  $\text{TiO}_2$  — анатаза или рутила. Недостаток порошков  $\text{TiO}_2$ , связанный с относительно высокой плотностью их частиц, затрудняющей их использование в «электронных чернилах», может быть преодолен с использованием криохимических методов путем синтеза полых сферических частиц  $\text{TiO}_2$  [100]. Для этого гидратированный  $\text{TiO}_2$  осаждают на поверхности микросфер из полиметилметакрилата с последующей сублимационной сушкой и удалением пластиковых темплатов пиролизом на воздухе. По сравнению с термической сушкой при нормальном давлении, использование сублимационной сушки позволяет существенно увеличить сохранность микросфер в ходе синтеза.

Весьма активно используются неорганические криоструктураты и при синтезе материалов биомедицинского назначения. Исключительно высокая биосовместимость трикальциевого фосфата (ТКФ) делает пористые каркасы на его основе перспективным материалом для создания биосовместимых носителей лекарственных препаратов как в виде сорбентов, так и в виде микрокапсул [103]. Другим соединением, при использовании которого в биоматериалах активно применяются криометоды, является гидроксипатит — один из лучших материалов для биосовместимой керамики. Предотвращение образования прочных агломератов при сушке приводит к значительному повышению активности порошков гидроксипатита к спеканию, что позволяет получать плотную керамику при более низких температурах [104, 105], а использование процессов направленной кристаллизации льда при замораживании осадков позволяет получать из них пористую керамику с регулируемым размером цилиндрических ориентированных пор [106, 107]. Введение гидроксипатита в водные растворы полимеров натурального и синтетического происхождения с последующим замораживанием и сублимационной сушкой позволяет формировать композитные объемные каркасы, которые, наряду с керамикой на основе фосфатов кальция, можно использовать в качестве материала для имплантатов костей и их фрагментов [108–111].

Микросферы  $\text{YPO}_4$ , полученные сублимационной сушкой соответствующих осадков, после нейтронного облучения, приводящего к превращению стабильного  $^{89}\text{Y}$  в бета-излучатель  $^{90}\text{Y}$ , становятся эффективным инструментом внутриартериальной радиотерапии [112]. Аналогичную процедуру, основанную на восстановлении  $\text{HAuCl}_4$  при помощи  $\text{NaBH}_4$  в водном растворе с последующим отделением осадка и его сублимационной сушкой, можно использовать и для получения нанопорошков золота. Наряду с их

высокой каталитической активностью все большее внимание исследователей вызывает способность этих порошков к плазмонному резонансу, в том числе при наличии различных функциональных групп на поверхности наночастиц. Важным преимуществом криохимического метода изоляции наночастиц в данном случае является сохранение при сушке способности частиц к последующему редиспергированию и плазмонному резонансу [113, 114]. Использование в качестве восстановителя 2-[4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинил]этансульфоновой кислоты (HEPES) вместо боргидрида натрия позволяет получать наночастицы золота сложной разветвленной формы [115].

## 7.4. Низкотемпературные методы изоляции наночастиц

Одним из основных методов изучения многостадийных химических реакций является анализ их промежуточных продуктов. Наиболее достоверные результаты такого анализа могут быть получены *in situ*, при проведении соответствующих измерений в реальном времени и в реакционной среде. К сожалению, в ряде случаев это невозможно вследствие ограничений, накладываемых, например, методами исследования, когда необходимая продолжительность анализа промежуточного продукта превышает продолжительность протекания всей реакции. В таких случаях обычно прибегают к изоляции интермедиатов от реакционной среды и их стабилизации, позволяющей провести детальное изучение продуктов при обычных условиях. В случае твердофазных реакций, обычно протекающих при достаточно высоких температурах, для выделения промежуточных продуктов часто используют закалку, т. е. быстрое охлаждение реакционной смеси до температур, при которых дальнейшее протекание реакции становится невозможным. При исследовании реакций осаждения из водных растворов используется закалка реакционных сред быстрым охлаждением до температур жидкого азота. Удаление растворителя для дальнейшего анализа продуктов реакции в таких случаях проводят при помощи сублимационной сушки. Эффективность такого подхода была показана при изучении процессов формирования и последующих превращений в водных растворах наночастиц  $\text{TiO}_2$  [116, 117],  $\text{ZrO}_2$  [118],  $\text{ZnO}$  [119], фосфата кальция и его производных [120–123].

Гидротермальный синтез из водных растворов является одним из эффективных и широко используемых методов получения наночастиц индивидуальных и сложных оксидов. Важной особенностью этого метода является достаточно высокая степень кристаллографического упорядочения образующихся твердых продуктов синтеза. При использовании многих



других химических методов синтеза нанопорошков осуществление процессов термоллиза прекурсоров при относительно низких температурах часто приводит к получению продуктов с низкой степенью кристаллографического упорядочения вплоть до полной аморфизации. Дальнейшая термообработка таких порошков с целью получения хорошо закристаллизованных продуктов обычно сопровождается нежелательными процессами образования прочных агломератов и роста наночастиц порошка. Подобные проблемы существуют и при изоляции нанокристаллических продуктов гидротермального синтеза от жидкой реакционной среды; высокая поверхностная энергия этих наночастиц способствует протеканию процессов агрегации и агломерации при атмосферной сушке. Для решения этой задачи в качестве последней стадии гидротермального синтеза нанопорошков во многих случаях используется замораживание и сублимационная сушка реакционных смесей [124–132].

Еще одним примером эффективного применения низкотемпературных методов для изоляции наночастиц является их использование при синтезе магнитных наноматериалов. Наноразмерные частицы ферро- и ферритмагнитных материалов демонстрируют не только интенсивное количественное, но и качественное влияние их размера на магнитные характеристики. Поведение и механизм взаимодействия суперпарамагнитных, одно- и полидоменных ферро- и ферритмагнитных частиц с магнитным полем имеют ряд существенных различий при том, что отличаться друг от друга они могут только размерами. При росте размера частиц оксидов железа до 100 нм может наблюдаться изменение механизма диссипации энергии переменного магнитного поля от вращения суперпарамагнитных частиц в вязкой среде к движению доменной стенки в полидоменных частицах. Такое различие в механизмах и интенсивности рассеяния энергии магнитного поля весьма существенно для ряда биомедицинских применений магнитных наночастиц. При этом на характер поведения частиц в переменном магнитном поле оказывают влияние процессы не только роста частиц, но и их агрегации и агломерации. В зависимости от характера, прочности и ориентации межчастичных контактов в агломерате, соседние наночастицы могут демонстрировать либо полностью независимое, либо кооперативное поведение в магнитном поле.

Такие магнитные наночастицы часто синтезируют и хранят в качестве твердых компонентов суспензий в водных и неводных средах при том, что большинство исследований их магнитных свойств может быть реализовано только в твердой фазе. Вследствие этого обстоятельства замораживание суспензий и магнитных жидкостей с последующей сублимационной сушкой достаточно широко используется как метод пробоподготовки на-

ночастиц, синтезированных в жидкой фазе, к измерениям их магнитных [133–139] и каких-либо других характеристик [140, 141].

Для синтеза гидрофобных частиц используются неводные растворители, многие из которых имеют низкие температуры замерзания, что не позволяет использовать сублимационную сушку для их удаления. В таких случаях сначала проводят замещение дисперсионной среды на близкий по полярности органический растворитель, обладающий достаточно высокой температурой кристаллизации и заметным давлением паров над твердой фазой при комнатной температуре [142], с последующим замораживанием и сублимационной сушкой [143].

Методы управления свойствами наночастиц при их выделении из жидкой фазы успешно используются и в промышленности. Все более широкое использование наночастиц и нанопорошков в различных производствах создает ряд проблем, связанных с особенностями загрязнения производственной среды потенциально опасными наночастицами. Эта проблема особенно остро стоит в ядерной индустрии и радиохимических производствах, где требования к производственной безопасности особенно высоки. Риски, связанные с использованием наночастиц в промышленности, можно существенно уменьшить путем их гранулирования. Исследования подтверждают, что формирование гранул размером от нескольких десятков микрон до нескольких миллиметров путем распыления в жидкий азот суспензии наночастиц, содержащей водорастворимое связующее, с последующей сублимационной сушкой и небольшой термообработкой позволяет существенно уменьшить пылеобразование при работе с такими порошками [144].

Другим важным для промышленности положительным эффектом гранулирования является значительное повышение текучести порошков [145, 146]. Высокая поверхностная энергия и большая поверхность контакта частиц между собой приводят к их интенсивному налипанию на рабочие поверхности и большому внутреннему трению, резко снижающему текучесть тонких порошков. Последний эффект крайне важен и при использовании нанопорошков для получения высокоплотной керамики, поскольку значительное внутреннее трение способствует возникновению значительных внутренних напряжений при компактировании таких порошков перед спеканием, что препятствует достижению максимальных значений плотности. Использование низкотемпературного гранулирования позволяет в значительной мере снять остроту и этой проблемы [147, 148].

При этом важно отметить, что использование низкотемпературных методов синтеза не является универсальным методом борьбы со всеми возможными проблемами, возникающими при синтезе и использовании нанопорошков. Известно, например, что активность катализатора на осно-

ве нанокристаллического цеолита, локализованного в порах компактного цеолитового носителя, при использовании атмосферной сушки в процессе синтеза заметно выше, чем при сублимационной [149]. Это различие авторы связывают с образованием дополнительных мезопор при агрегации и агломерации наночастиц цеолита в ходе атмосферной сушки. При использовании сублимационной сушки, препятствующей такой агрегации, сопутствующего ей положительного эффекта также не наблюдается.

## 7.5. Низкотемпературные методы в синтезе углеродных наноматериалов

Одним из наиболее известных типов объемных углеродных наноматериалов являются пористые материалы, также относящиеся к классу криоструктуратов и во многом схожие по своему строению с аэрогелями, но синтезируемые при атмосферном давлении с использованием низкотемпературных методов. Заключительной стадией их синтеза обычно является пиролиз полимерных прекурсоров в аргоне или азоте при температурах 800–1000 °С. Для получения полимерных прекурсоров чаще всего используется реакция поликонденсации резорцина и формальдегида в водном растворе над щелочным катализатором, обычно  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Замораживание и сублимационная сушка образующегося полимерного гидро/органогеля приводят к формированию полимерного каркаса с порами микронного размера, образующимися при замораживании и последующей сублимации кристаллитов замороженного растворителя. Процесс карбонизации полимера при термообработке такого каркаса без доступа воздуха приводит к образованию большого количества мезопор в стенках крупных микропор. Таким образом, характерной особенностью углеродных материалов, синтезируемых этим методом, является отчетливо выраженный бимодальный характер пористости [150–154].

Сопоставление микроструктур пористых полимерных гелей, полученных из полимерного гидрогеля с использованием различных методов сушки и последующей карбонизацией, показывает, что продукт атмосферной сушки (ксерогель) имеет наиболее высокую плотность, сохраняя, тем не менее, значительное количество мезопор, благодаря чему его удельная поверхность остается достаточно высокой ( $\sim 900 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$ ) [154]. Плотность продукта сверхкритической сушки существенно меньше, чем у ксерогеля, при сопоставимой с ним удельной поверхности ( $\sim 1000 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$ ), а при сублимационной сушке полимерного гидрогеля, наряду с низкой плотностью, достигались и наиболее высокие значения удельной поверхности ( $\sim 2500 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$ ).

Наряду с методом сушки, микроструктурой углеродного каркаса можно управлять изменением соотношения компонентов к катализатору и условий проведения поликонденсации. Заметное воздействие оказывают и условия пиролиза полимерного каркаса, оптимизацией которых можно добиться устойчивого повышения удельной поверхности до значений свыше  $2000 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$  [155]. Значительные усилия направлены на поиск более дешевых и экологичных альтернатив резорцин-формальдегидному гелю в качестве прекурсора, в частности, среди производных танина и фурфурола [156–160].

Сферы применения углеродных каркасных наноматериалов, как правило, связаны с их высокой удельной поверхностью. Они могут эффективно использоваться в качестве носителей катализаторов, эксплуатирующихся в неокислительных средах [161–165], или как сорбенты многих органических продуктов и соединений [155, 166–168]. Благодаря сочетанию высокой удельной поверхности и хорошей электронной проводимости углеродные каркасные материалы активно исследуются в качестве перспективных электродных материалов для суперконденсаторов [169–175]. Модификация элементов скелета углеродных каркасов азотсодержащими группами приводит к существенному повышению функциональных характеристик электрода как за счет его лучшего смачивания электролитом, так и за счет дополнительной возможности сохранения энергии путем использования электрохимических реакций на его поверхности [172, 173].

Углеродные криоструктураты, обладающие одновременно низкой плотностью, высокой электропроводностью и значительной эластичностью, оказались удобной матрицей для создания анодных композитов для литий-ионных батарей с теми электрохимически активными компонентами, которые значительно увеличиваются в объеме при взаимодействии с ионами лития. Создание таких композитов позволяет предотвратить разрушение анодов и уменьшить механические напряжения, возникающие в них при электрохимическом циклировании в отсутствие углеродного демпфера [176, 177]. В то же время следует отметить, что механическая прочность углеродного каркаса таких материалов, как правило, слишком мала для их самостоятельного использования в качестве конструкционного материала. Его упрочнения можно добиться путем введения в реакционную смесь ультрадисперсных частиц и волокон на стадии синтеза полимерного прекурсора [175, 178, 179]. Аналогичный подход может быть использован для увеличения емкости углеродного сорбента путем создания его криокомпозиата с частицами цеолитов [180], а электронная проводимость каркаса может быть еще более увеличена за счет введения частиц графена в реакционную смесь при поликонденсации [181].

Объемные материалы на основе углерода можно создавать и из его индивидуальных наночастиц. Задачи, решаемые путем использования за-

мораживания и сублимационной сушки, в данном случае практически те же, что и для неорганических наночастиц — выделение твердых частиц из жидкой дисперсионной среды и формирование из них двумерных и трехмерных структур. Поскольку при синтезе и изоляции различных углеродных наночастиц сушка в сверхкритических условиях используется чаще, чем сублимационная, а микроstructures образующихся продуктов весьма схожи, объемные углеродные материалы, формируемые низкотемпературными методами, по аналогии часто называют аэрогелями.

Следует учитывать также, что терминология, используемая для обозначения схожих материалов, у разных авторов может достаточно сильно отличаться. В тех случаях, когда образование однослойных частиц графена в работе не подтверждается экспериментально, редколлегия журнала «Carbon» рекомендует использовать термин «графеновые материалы» [182], хотя на практике этой рекомендации следуют немногие. Для получения частиц, называемых авторами графеновыми, используется восстановление деламинарованного оксида графита [183–186], синтез из метана методом CVD на катализаторе MgO [187] и интенсивное ультразвуковое воздействие на графит в специально подобранном неполярном растворителе [188]. В последнем случае выход графеновых частиц должен быть максимален, поскольку настоящий, однослойный графен гидрофобен [189]. В то же время хорошая редиспергируемость в воде продуктов, полученных другими методами, указывает на заметное содержание полярных групп на поверхности этих частиц. Объемные материалы, формируемые из них низкотемпературными методами, часто обладают хорошими функциональными свойствами: удельной поверхностью свыше  $2000 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$ , высокой сорбционной емкостью по метану [187], высокой электрохимической емкостью при использовании в качестве электрода суперконденсатора [183] или анода литий-ионного аккумулятора [186].

Быстро растет количество различных областей применения как гидрофобных и проводящих графеновых материалов — продуктов восстановления многослойных оксидов графена, так и самих этих оксидов, гидрофильных и плохо проводящих электричество. Эти применения основаны как на их высокой сорбционной емкости [190–192], так и на высокой каталитической активности в ряде реакций [193, 194]. Как оксид графена, так и продукты его полного и частичного восстановления способны образовывать достаточно прочные объемные каркасы при замораживании и сублимационной сушке их суспензий. Направленная кристаллизация льда при замораживании позволяет формировать материалы с ориентированными порами регулируемого размера [190, 192, 195], которые могут использоваться в качестве носителей каталитически активных наночастиц золота и серебра [195].

Низкотемпературные методы успешно применяются и при синтезе углеродных нанотрубок (УНТ) на стадии их очистки. Основным методом получения УНТ является каталитическое разложение углеводородов. Для использования УНТ в большинстве случаев требуется их очистка от металлических катализаторов, которые растворяют в кислотах с последующей тщательной промывкой УНТ. Разделение различных видов УНТ, часто образующихся одновременно при синтезе методом CVD, также обычно проводят в жидких средах. Сушка на воздухе образующихся продуктов приводит к значительной агрегации УНТ, в то время как продукты их сублимационной сушки легко редиispersируются и обладают хорошей текучестью [196–199]. В то же время пористые каркасы, формируемые из концентрированных суспензий УНТ низкотемпературными методами, обладают довольно высокой прочностью, особенно при добавлении небольшого количества полимерного связующего, а их макропористостью можно управлять в достаточно широких пределах [200–203]. Высокая электропроводность таких каркасов делает их весьма перспективными для использования в качестве электродов топливных ячеек с полимерным электролитом [200, 203]. Новой и перспективной областью применения этих материалов является их использование в качестве компонентов радиопоглощающих покрытий. Авторам [204] удалось создать объемный радиопоглощающий материал на основе УНТ, отражающая способность которого заметно ниже, чем у существующих коммерческих аналогов. При этом использование атмосферной сушки суспензии УНТ вместо сублимационной приводит к значительному ухудшению радиопоглощения в миллиметровом диапазоне, а дальнейшее увеличение электропроводности УНТ путем их *p*- и *n*-допирования заметно улучшает его.

Как УНТ, так и производные графена известны как эффективные добавки, увеличивающие электропроводность различных материалов. Это их свойство в сочетании с наноразмерами, способствующими их равномерному распределению между более крупными частицами, оказалось весьма полезным при синтезе электродных материалов для электрохимических суперконденсаторов [205], а также некоторых анодных материалов для литиевых аккумуляторов, претерпевающих значительное изменение в объеме при электрохимическом циклировании, приводящее к потере электрического контакта между частицами анодного материала [206–208]. Заметное улучшение электрохимических характеристик наблюдалось и при введении небольшого количества восстановленного оксида графена в электродный материал на основе УНТ [209].

Наряду с повышением электропроводности, введение малых ( $\sim 1\%$ ) количеств УНТ с использованием низкотемпературных методов может приводить и к значительному улучшению трещиностойкости алюмооксидной

керамики, полученной методом горячего прессования [210]. В таких случаях для обеспечения лучшего контакта с оксидными частицами поверхность УНТ обычно подвергается окислению. Введение 4% УНТ в медный порошок перед искровым плазменным спеканием привело к существенному повышению микротвердости по Виккерсу и износостойчивости образующегося композита [211] при том, что теплопроводность оказалась даже меньше, чем у чистой меди [212]. Крайне эффективным оказалось использование малых количеств УНТ (0,1–0,2%) и для улучшения механических характеристик пористых биоматериалов на основе биополимеров – желатина и хитозана; их введение в водный раствор полимеров с последующим замораживанием и сублимационной сушкой приводило, в частности, к 10-кратному повышению модуля упругости [213].

## Заключение

Результаты исследований, упомянутые в настоящей главе, показывают, что сравнительно ограниченное число криохимических приемов и методов оказывается полезным при получении большого количества разнообразных неорганических нано- и биоматериалов. При этом, как правило, используются две основные особенности этих методов: высокая химическая однородность многокомпонентных прекурсоров, обусловленная реализацией большинства используемых химических процессов на значительном удалении от термодинамического равновесия, и возможность целенаправленно изменять в широких пределах поровую структуру синтезируемых материалов на макро- и мезоуровне. Важным преимуществом низкотемпературных методов получения материалов из растворов и суспензий является наличие большой гаммы промышленно производимого оборудования для сублимационной сушки, что существенно облегчает масштабирование предлагаемых процессов синтеза от лабораторного до опытно-промышленного и промышленного уровней. Несмотря на более чем 40-летнюю историю использования низкотемпературных методов в синтезе функциональных материалов, они остаются удобным, современным и эффективным методом их получения.

Одним из видов функциональных материалов, которые в ряде случаев можно отнести и к конструкционным, являются биоматериалы. Поскольку в большинстве случаев условия их использования не налагают каких-либо дополнительных ограничений на методы синтеза, а сферы применения весьма разнообразны, в настоящем обзоре они не рассматривались отдельно от других видов наноматериалов. Эти сферы различны для наночастиц и для объемных материалов. Помимо выделения из жидкой фазы нано-

частиц производных фосфата кальция, кремнезема и соответствующих нанокomпозитов для изучения их свойств [120–124], низкотемпературные методы могут использоваться при синтезе этих частиц для последующего использования в качестве сорбентов-носителей иммобилизованных клеток микроорганизмов [30] и лекарственных препаратов [91, 103].

Отдельной и весьма перспективной областью применения наночастиц благородных металлов, основанной на их способности к плазмонному резонансу, является фототермическая противоопухолевая терапия, в которой они используются в качестве медиаторов, концентрирующих и передающих тканям энергию электромагнитного излучения [113, 114]. Микросферы из частиц фосфата иттрия после облучения нейтронами становятся источниками бета-излучения, которые могут быть использованы для внутриартериальной терапии опухолей [112]. Порошки гидроксилалатита, синтезированные с использованием криохимических методов, могут применяться для получения керамики на его основе, являющейся одним из основных видов керамических биоматериалов [104, 105]. Наиболее же распространенным видом объемных биоматериалов, синтезируемых с использованием криометодов, являются так называемые скаффолды — объемные пористые каркасы, которые могут содержать как неорганические, так и полимерные компоненты. Благодаря высокой биосовместимости и способности к постепенному замещению костной тканью или ее наращиванию на своей поверхности, они находят широкое применение при имплантации [60, 106–111, 213]. Важным преимуществом криохимических методов синтеза в данном случае является упоминавшаяся ранее возможность модифицировать в широких пределах поровую структуру скаффолдов за счет изменения условий их синтеза и состава используемых прекурсоров.

Следует отметить также, что данный обзор посвящен получению нано- и биоматериалов криохимическими методами из водных растворов. Помимо этой большой и разветвленной группы методов криохимического синтеза, существует также ряд методов совершенно иной физико-химической природы, позволяющих получать наночастицы не только при низких, но и при криогенных температурах в пленках полимеров и в конденсатах замороженных паров и газов. Многие из этих методов достаточно хорошо изучены с научной точки зрения и описаны в ряде обзоров и монографий [214–217], а также будут рассмотрены в других главах настоящего сборника.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 16-08-00900).



## Авторы

**Шляхтин Олег Александрович**, д.х.н., ведущий научный сотрудник Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Область научных интересов: химические методы синтеза функциональных материалов и наноматериалов, процессы и продукты криохимического синтеза.

**Лозинский Владимир Иосифович**, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией ИНЭОС РАН им. А.Н. Несмеянова. Область научных интересов: криоструктурирование полимерных систем, криогели и криоструктураты на основе синтетических и природных полимеров, практическое применение криогенно-структурированных полимерных материалов.

## Литература

1. *Landsberg A., Campbell T.T.* Freeze dry technique for making ultra-fine metal powder. — *Journal of Metals*, 1965, **17**, 856.
2. *Eckman M., Persson K., Grimvall G.* Phase diagram and lattice instability in tungsten-rhenium alloys. — *Journal of Nuclear Materials*, 2000, **278**, 273.
3. *Третьяков Ю.Д., Олейников Н.Н., Можжаев А.П.* Основы криохимической технологии. — Москва, Высшая школа, 1987. — 143 с.
4. *Tretyakov Yu.D., Oleynikov N.N., Shlyakhtin O.A.* Cryochemical technology of advanced materials. — London, Chapman & Hall. 1997. — 304 p.
5. *Tretyakov Yu.D., Shlyakhtin O.A.* Recent progress in cryochemical synthesis of oxide materials. — *Journal of Materials Chemistry*, 1999, **9**, 19.
6. *Shlyakhtin O.A., Oleinikov N.N., Tretyakov Yu.D.* Cryochemical synthesis of materials. 77-138. — in *Chemical Processing of Ceramics (2<sup>nd</sup> Edition)*, vol. 28, Materials Engineering Series, CRC Press LLC, 2005. — 750 p.
7. *Shlyakhtin O.A., Oh Y.-J.* Inorganic cryogels for energy saving and conversion. — *Journal of Electroceramics*, 2009, **23**, 452.
8. *Shlyakhtin O.A.* Inorganic cryogels. — *Advances in Polymer Sciences*, 2014, **263**, 223.
9. *Генералов М.Б.* Основы криохимической нанотехнологии. 138-141. — Москва, Академкнига, 2006. — 325 с.
10. *Кузнецова И.А., Клевлев В.М., Колтунов В.В., Трутнев Н.С.* Исследование структурно-механических свойств нанопорошков после интенсивных нагрузок. — *Химическое и нефтегазовое машиностроение*, 2009, **45**, 3.
11. *Trusova E.A., Trutnev N.S.* Cryochemical synthesis of ultrasmall, highly crystalline, nanostructured metal oxides and salts. — *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2018, **9**, 1755.
12. *Petrykin V., Kakihana M.* Chemistry and applications of polymeric gel precursors. 77-103. — in *Handbook of Sol-Gel Science and Technology*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. vol. 1, 2005. — 680 p.; *Kakihana M.* Synthesis of high performance ceramics based on polymerizable complex method. — *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 2007, **117** (1368), 857.
13. *Jing Y., Patakanas J., Lund P.D., Zhu B.* An improved synthesis method of ceria-carbonate based composite electrolytes for low-temperature SOFC fuel cells. — *International Journal of Hydrogen Energy*, 2013, **38**, 16532.

14. *Fujioka Y., Frantti J., Asiri A.M., Obaid A.Y., Jiang H., Nieminen R.M.* Structural properties of pure and nickel-modified nanocrystalline tungsten trioxide. — *Journal of Physical Chemistry C*, 2012, **116**, 17029.
15. *Tezuka S., Sato Y., Komukai T., Takatsuka Y., Kato H., Kakihana M.* Eu<sup>2+</sup>-Activated CaSrSiO<sub>4</sub>: a new red-emitting oxide phosphor for white-light-emitting diodes. — *Applied Physics Express*, 2013, **6**, 072101.
16. *Iwamura M., Petrykin V., Kakihana M.* Preparation of YVO<sub>4</sub>: Eu<sup>3+</sup> phosphors via micro-gel spray freeze-drying process. — *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 2007, **115**, 920.
17. *Junliang L., Yanwei Z., Cuijing G., Wei Z., Xiaowei Y.* One-step synthesis of barium hexaferrite nano-powders via microwave-assisted sol-gel auto-combustion. — *Journal of the European Ceramic Society*, 2010, **30**, 993.
18. *Wang X., Sumboja A., Khoo E., Yan C., Lee P.S.* Cryogel synthesis of hierarchical interconnected macro-/mesoporous Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> with superb electrochemical energy storage. — *The Journal of Physical Chemistry C*, 2012, **116**, 4930.
19. *Xiao Q., Tang X., Liu Y., Zhong Y., Zhu W.* A facile starch-assisted sol-gel method to synthesize K-doped Li<sub>2</sub>ZrO<sub>3</sub> sorbents with excellent CO<sub>2</sub> capture properties. — *Journal of the American Ceramic Society*, 2012, **95**, 1544.
20. *Xiao Q., Tang X., Liu Y., Zhong Y., Zhu W.* Comparison study on strategies to prepare nanocrystalline Li<sub>2</sub>ZrO<sub>3</sub>-based absorbents for CO<sub>2</sub> capture at high temperatures. — *Frontiers in Chemical Science and Engineering*, 2013, **7**, 297.
21. *Любавицъ Н.Н.* О замерзании некоторых коллоидальных растворовъ. — *Журнал Русского Физико-химического Общества, Химическое отделение*, 1889, **21**, 397.
22. *Дьячковский С.И.* Влияние низких температур на состояние коллоидных систем. — *Журнал общей химии*. 1931, **1**, 964.
23. *Viszagh A.* Über den Einfluss des Gefrierens auf die Peptisierbarkeit der Gele. — *Kolloid-Zeitschrift*, 1956, **146**, 133.
24. *Золотавин В.Л., Вольхин В.В., Резвушкин В.В.* Действие замораживания на свойства коагулятов гидроокисей металлов. 1. Влияние условий замораживания и оттаивания на свойства коагулята гидроокиси железа. — *Коллоидный журнал*, 1960, **22**, 305.
25. *Вольхин В.В., Пономарев Е.И., Львович Б.И., Колесова С.А.* Применение замораживания для коагуляции разбавленных коллоидных растворов и гранулирования неорганических сорбентов. — *Известия СО АН СССР. Серия химических наук*. 1965, № 11, 57.
26. *Вольхин В.В., Пономарев Е.И., Золотавин В.Л.* Действие замораживания на свойства коагулятов гидроокисей металлов. Влияние механизма вымораживания воды. — *Коллоидный журнал*, 1973, **35**, 144.
27. *Айлер Р.К.* Химия кремнезема. — пер. с англ., Москва, Мир, 1982, т. 1. 536 с.
28. *Wijnen P.W.J.G., Beelen T.P.M., Ruttens K.P.J., Saeijs H.C.P.L., De Haan J.W., Van De Ven L.J.M., Van Santen R.A.* The molecular basis of aging of aqueous silica gel. — *Journal of Colloid and Interface Sciences*, 1991, **145**, 17.
29. *Сергеев Г.Б., Батюк В.А.* Реакции в многокомпонентных замороженных системах. — *Успехи химии*. 1976, **45**, 793.
30. *Слабова О.И., Никитин Д.И., Лозинский В.И., Кулакова В.К., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* Окисление водорода иммобилизованными в силикагель и криосиликагель клетками олиготрофных бактерий. — *Микробиология*. 1988, **57**, 940.
31. *Лозинский В.И.* Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения. — *Успехи химии*. 2002, **71**, 559.

32. *Lozinsky V.I., Okay O.* Basic principles of cryotropic gelation. — *Advances in Polymer Science*, 2014, **263**, 49.
33. *Лозинский В.И.* Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и применение. — Дис. докт. хим. наук, М.; ИИЭОС РАН, 1994, 682 с.
34. *Lozinsky V.I., Bakeeva I.V., Presnyak E.P., Damshkaln L.G., Zubov V.P.* Cryostructuring of polymer systems. XXVI. Heterophase organic-inorganic cryogels prepared via freezing-thawing of aqueous solutions of poly(vinyl alcohol) with added tetramethoxysilane. — *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, **105**, 2689.
35. *Wang R., Crozier P.A., Sharma R., Adams J.B.* Nanoscale heterogeneity in ceria zirconia with low-temperature redox properties. — *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, **110**, 18278.
36. *Панова Т.И., Глушкова В.Б., Лапилин А.Е.* Синтез нанокристаллических твердых растворов на основе диоксидов циркония и гафния. — *Физика и химия стекла*, 2008, **34**, 365.
37. *Yang H., Nie S.* Preparation and characterization of Co-doped ZnO nanomaterials. — *Materials Chemistry and Physics*, 2009, **114**, 279.
38. *Kirit S., Dimple S.* Characterization of nanocrystalline cobalt doped TiO<sub>2</sub> sol-gel material. — *Journal of Crystal Growth*, 2012, **352**, 224.
39. *Vanea E., Simon V.* XPS and Raman study of zinc containing silica microparticles loaded with insulin. — *Applied Surface Science*, 2013, **280**, 144.
40. *Naci Koc S., Oksuzomer F., Yasar E., Akturk S., Gurkaynak M.A.* Effect of sol-gel modifications on formation and morphology of nanocrystalline lanthanum aluminate. — *Materials Research Bulletin*, 2006, **41**, 2291.
41. *Chesnaud A., Bogicevic C., Karolak F., Estournes C., Dezanneau G.* Preparation of transparent oxyapatite ceramics by combined use of freeze-drying and spark-plasma sintering. — *Chemical Communications*, 2007, 1550.
42. *Mionic M., Alexander D.T.L., Forro L., Magrez A.* Influence of the catalyst drying process and catalyst support particle size on the carbon nanotubes produced by CCVD. — *Physica Status Solidi (b)*, 2008, **245**, 1915.
43. *Moriyama D., Hirata Y., Sameshima S., Matsunaga N., Doi T., Kashima N., Nagaya S.* Synthesis and electrical conductivity of La<sub>0.6</sub>Sr<sub>0.4</sub>Ru<sub>0.9</sub>Mg<sub>0.1</sub>O<sub>3-δ</sub> perovskite solid solution. — *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 2009, **117**, 635.
44. *Shiratani K., Hirata Y., Sameshima S., Matsunaga N., Nakahara S.* Synthesis and electrical conductivity of La-Sr-X-Mg-O (X=Ti, Zr, Al) perovskite solid solution. — *Ceramics International*, 2011, **37**, 1525.
45. *Chao C., Ren Z., Liu Z., Xiao Z., Xu G., Li X., Wei X., Shen G., Han G.* Molecular-mediated crystal growth of PbTiO<sub>3</sub> nanostructure on silicon substrate. — *Applied Surface Science*, 2011, **257**, 9768.
46. *Shlyakhtin O.A., Skundin A.M., Yoon S.J., Oh Y.J.* Ni-Mn hydroxides as new high power electrode materials for supercapacitor applications. — *Materials Letters*, 2009, **63**, 109.
47. *Shlyakhtin O.A., Mazo G.N., Malyshev S.A., Kolchina L.N., Knot'ko A.V., Loktev A./S., Dedov A.G.* Cryogel synthesis and solid state reactivity of NdCaCoO<sub>4</sub>. — *Materials Research Bulletin*, 2013, **48**, 245.
48. *Kurilenko K.A., Shlyakhtin O.A., Petukhov D.I., Garshev A.V.* Effect of CeO<sub>2</sub> coprecipitation on the electrochemical performance of Li(Li,Ni,Mn,Co)O<sub>2</sub>-CeO<sub>2</sub>-C composite cathode materials. — *Journal of Power Sources*, 2017, **354**, 189.
49. *Malyshev S.A., Shlyakhtin O.A., Mazo G. N., Garshev A.V., Mironov A.V., Loktev A.S., Dedov A.G.* Comparative analysis of NdCaCoO<sub>4</sub> phase formation from cryogel and from solid state precursors. — *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2017, **81**, 372.

50. Harelind H., Gunnarsson F., Vaghefi S.M.S., Skoglundh M., Carlsson P.A. Influence of the carbon-carbon bond order and silver loading on the formation of surface species and gas phase oxidation products in absence and presence of NO<sub>x</sub> over silver-alumina catalysts. — ACS Catalysis, 2012, **2**, 1615.
51. Kannisto H., Arve K., Pingel T., Hellman A., Harelind H., Eranen K., Olsson E., Skoglundh M., Murzin D.Y. On the performance of Ag/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> as a HC-SCR catalyst— influence of silver loading, morphology and nature of the reductant. — Catalysis Science and Technology, 2013, **3**, 644.
52. Gunnarsson F., Zheng J.Y., Kannisto H., Cid C., Lindholm A., Milh M., Skoglundh M., Harelind H. Influence of ageing, silver loading and type of reducing agent on the lean NO<sub>x</sub> reduction over Ag-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalysts. — Topics in Catalysis, 2013, **56**, 416.
53. Kirchhoff M., Specht U., Vesper G. Engineering high-temperature stable nanocomposite materials. — Nanotechnology, 2005, **16**, S401.
54. Osaki T., Shima S., Miki T., Tai Y. Improved thermal stability of Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> cryogels by controlling sol-gel conditions. — Catalysis Letters, 2012, **142**, 541.
55. Osaki T., Yamada K., Watari K., Tajiri K., Shima S., Miki T., Tai Y. Palladium-alumina cryogel with high thermal stability and CO oxidation activity. — Catalysis Letters, 2012, **142**, 95.
56. Kim H.J., Choi S.M., Nam S.H., Seo M.H., Kim W.B. Carbon-supported PtNi catalysts for electrooxidation of cyclohexane to benzene over polymer electrolyte fuel cells. — Catalysis Today, 2009, **146**, 9.
57. Kim H.J., Choi S.M., Nam S.H., Seo M.H., Kim W.B. Effect of Rh content on carbon-supported PtRh catalysts for dehydrogenative electrooxidation of cyclohexane to benzene over polymer electrolyte membrane fuel cell. — Applied Catalysis A, 2009, **352**, 145.
58. Lee S., Kim H.J., Choi S.M., Seo M.H., Kim W.B. The promotional effect of Ni on bimetallic PtNi/C catalysts for glycerol electrooxidation. — Applied Catalysis A, 2012, **429-430**, 39.
59. Choi J.H., Park K.W., Park I.S., Kim K., Lee J.S., Sung Y.E. A PtAu nanoparticle electrocatalyst for methanol electro-oxidation in direct methanol fuel cells. — The Journal of Electrochemical Society, 2006, **153**, A1812.
60. Jalota S., Bhaduri S.B., Cuneyt Tas A. A new rhenanite (β-NaCaPO<sub>4</sub>) and hydroxyapatite biphasic biomaterial for skeletal repair. — Journal of Biomedical Materials Research B, 2007, **80**, 304.
61. Osaki T., Nagashima K., Watari K., Tajiri K. Silica-doped alumina cryogels with high thermal stability. — Journal of Non-Crystalline Solids, 2007, **353**, 2436.
62. Wang X., Ma Y., Li S., Zhu B., Muhammed M. SDC/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>nanocomposite: New freeze drying based synthesis and application as electrolyte in low-temperature solid oxide fuel cells. — International Journal of Hydrogen Energy, 2012, **37**, 19380.
63. Han C., Ma Y., Pei C. Preparation and characterization of silica composite xerogels with broadband absorption in mid- and far-infrared windows. — Journal of Non-Crystalline Solids, 2013, **369**, 5.
64. Jimeno C., Miras J., Esquena J. TiO<sub>2</sub>(SiO<sub>2</sub>)<sub>x</sub> and ZrO<sub>2</sub>(SiO<sub>2</sub>)<sub>x</sub> cryogels as catalysts for the citronellal cyclization to isopulegol. — Catalysis Letters, 2013, **143**, 616.
65. Cao Y.C. Preparation of thermally stable well-dispersed water-soluble CdTe quantum dots in montmorillonite clay host media. — Journal of Colloid and Interface Science, 2012, **368**, 139.
66. Ko H.H., Chen H.T., Yen F.L., Lu W.C., Kuo C.W., Wang M.C. Preparation of TiO<sub>2</sub> nanocrystallite powders coated with 9 mol.% ZnO for cosmetic applications in sunscreens. — International Journal of Molecular Sciences, 2012, **13**, 1658.

67. Harelind H., Gunnarsson F., Vaghefi S.M.S., Skoglundh M., Carlsson P.A. Influence of the carbon-carbon bond order and silver loading on the formation of surface species and gas phase oxidation products in absence and presence of NO<sub>x</sub> over silver-alumina catalysts. — ACS Catalysis, 2012, **2**, 1615.
68. Kannisto H., Arve K., Pingel T., Hellman A., Harelind H., Eranen K., Olsson E., Skoglundh M., Murzin D.Y. On the performance of Ag/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> as a HC-SCR catalyst— influence of silver loading, morphology and nature of the reductant. — Catalysis Science and Technology, 2013, **3**, 644.
69. Gunnarsson F., Zheng J.Y., Kannisto H., Cid C., Lindholm A., Milh M., Skoglundh M., Harelind H. Influence of ageing, silver loading and type of reducing agent on the lean NO<sub>x</sub> reduction over Ag-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalysts. — Topics in Catalysis, 2013, **56**, 416.
70. Kirchhoff M., Specht U., Vesper G. Engineering high-temperature stable nanocomposite materials. — Nanotechnology, 2005, **16**, S401.
71. Osaki T., Shima S., Miki T., Tai Y. Improved thermal stability of Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> cryogels by controlling sol-gel conditions. — Catalysis Letters, 2012, **142**, 541.
72. Osaki T., Yamada K., Watari K., Tajiri K., Shima S., Miki T., Tai Y. Palladium-alumina cryogel with high thermal stability and CO oxidation activity. — Catalysis Letters, 2012, **142**, 95.
73. Kim H.J., Choi S.M., Nam S.H., Seo M.H., Kim W.B. Carbon-supported PtNi catalysts for electrooxidation of cyclohexane to benzene over polymer electrolyte fuel cells. — Catalysis Today, 2009, **146**, 9.
74. Kim H.J., Choi S.M., Nam S.H., Seo M.H., Kim W.B. Effect of Rh content on carbon-supported PtRh catalysts for dehydrogenative electrooxidation of cyclohexane to benzene over polymer electrolyte membrane fuel cell. — Applied Catalysis A, 2009, **352**, 145.
75. Lee S., Kim H.J., Choi S.M., Seo M.H., Kim W.B. The promotional effect of Ni on bimetallic PtNi/C catalysts for glycerol electrooxidation. — Applied Catalysis A, 2012, **429-430**, 39.
76. Choi J.H., Park K.W., Park I.S., Kim K., Lee J.S., Sung Y.E. A PtAu nanoparticle electrocatalyst for methanol electro-oxidation in direct methanol fuel cells. — The Journal of Electrochemical Society, 2006, **153**, A1812.
77. Shlyakhtin O.A., Oh Y.-J. Low Temperature Sintering of Zn<sub>3</sub>Nb<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ceramics from fine powders. — Journal of the American Ceramic Society, 2006, **89**, 3366.
78. Shlyakhtin O.A., Orlov A.V., Oh Y.-J. Liquid phase sintering of fine powders - a route to dense electroceramics at reduced temperatures. — J. Electroceramics, 2006, **17**, 405.
79. Shlyakhtin O. A., Oh Y.-J. A chemical route to BiNbO<sub>4</sub> ceramics. — International Journal of Applied Ceramic Technology, 2009, **6**, 312.
80. Gong H., Tang D.Y., Huang H. Agglomeration control of Nd:YAG nanoparticles via freeze drying for transparent Nd:YAG ceramics. — Journal of the American Ceramic Society, 2009, **92**, 812.
81. Gong H., Zhang J., Tang D.Y., Xie G.Q., Huang H., Ma J. Fabrication and laser performance of highly transparent Nd:YAG ceramics from well-dispersed Nd:Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopowders by freeze-drying. — Journal of Nanoparticle Research, 2011, **13**, 3853.
82. Suarez M., Fernandez A., Menendez J.L., Nygren M., Torrecillas R., Zhao Z. Hot isostatic pressing of optically active Nd:YAG powders doped by a colloidal processing route. — Journal of the European Ceramic Society, 2010, **30**, 1489.
83. Shlyakhtin O.A., Yoon Y.S., Choi S.H., Oh Y.-J. Freeze drying synthesis of LiNi<sub>0.5</sub>Mn<sub>0.5</sub>O<sub>2</sub> cathode materials. — Electrochimica Acta, 2004, **50**, 505.
84. Shlyakhtin O.A., Choi S.H., Yoon Y.S., Oh Y.-J. Accelerated synthesis and electrochemical performance of Li<sub>1-x</sub>(Ni<sub>0.5</sub>Mn<sub>0.5</sub>)O<sub>2</sub> cathode materials. — Journal of Power Sources, 2005, **141**, 122.

85. Jain G., Yang J., Balasubramanian M., Xu J.J. Synthesis, electrochemistry, and structural studies of lithium intercalation of a nanocrystalline  $\text{Li}_2\text{MnO}_3$ -like compound. — *Chemistry of Materials*, 2005, **17**, 3850.
86. Qi L., Fresnais J., Muller P., Theodoly O., Berret J.F., Chapel J.P. Interfacial activity of phosphonated-PEG functionalized cerium oxide nanoparticles. — *Langmuir*, 2012, **28**, 11448.
87. Li Y., Yao J., Uchaker E., Yang J., Huang Y., Zhang M., Cao G. Leaf-like  $\text{V}_2\text{O}_5$  nanosheets fabricated by a facile green approach as high energy cathode material for lithium-ion batteries. — *Advanced Energy Materials*, 2013, **3**, 1171.
88. Bianchi C.L., Ardizzone S., Cappelletti G. Surface state of sulfated zirconia: the role of the sol-gel reaction parameters. — *Surface and Interface Analysis*, 2004, **36**, 745.
89. Hessian M., Leone P., Suchaud M., LeBeau B., Nouali H., Guari Y., Prouzet E. Nanocrystalline iron oxide synthesized within Hierarchical Porous Silica prepared by nanoemulsion templating. — *Chemical Communications*, 2012, **48**, 10022.
90. Su L. F., Miao L., Tanemura S., Xu G. Low-cost and fast synthesis of nanoporous silica cryogels for thermal insulation applications. — *Science and Technology of Advanced Materials*, 2012, **13**, pp. 035003(1-6).
91. Prokopowicz M. Synthesis and in vitro characterization of freeze-dried doxorubicin-loaded silica xerogels. — *Journal of Sol Gel Science and Technology*, 2010, **53**, 525.
92. Lu P., Hsieh Y.L. Highly pure amorphous silica nano-disks from rice straw. — *Powder Technology*, 2012, **225**, 149.
93. Hashkovsky S.V., Shilova O.A., Kuznetsova L.A. Synthesis of porous inorganic materials from sol-gel precursors by cryochemical sublimation. — *Glass Physics and Chemistry*, 2005, **31**, 352.
94. Chen R., Luo Y., Sun J., Li G. Preparation and properties of an AP/RDX/ $\text{SiO}_2$  nanocomposite energetic material by the sol-gel method. — *Propellants Explosives Pyrotechnics*, 2012, **37**, 422.
95. Kuechl D.E., Benin A.I., Knight L.M., Abrevaya H., Wilson S.T., Sinkler W., Mezza T.M., Willis R.R. Multiple paths to nanocrystalline high silica beta zeolite. — *Microporous and Mesoporous Materials*, 2010, **127**, 104.
96. Rahman I.A., Vejayakumaran P., Sipaut C.S., Ismail J., Chee C.K. Effect of the drying techniques on the morphology of silica nanoparticles synthesized via sol-gel process. — *Ceramics International*, 2008, **34**, 2059.
97. Sinko K. Gel-derived porous alumina systems. — *Materials Letters*, 2013, **107**, 344.
98. Osaki T., Yamada K., Watari K, Tajiri K, Shima S, Miki T, Tai Y. Alumina cryogels with superior thermal stability for catalyst supports. — *Journal of Sol Gel Science and Technology*, 2012, **61**, 268.
99. Fazio S., Guzm'an J., Colomer M.T., Salomoni A., Moreno R. Colloidal stability of nanosized titania aqueous suspensions. — *Journal of the European Ceramic Society*, 2008, **28**, 2171.
100. Wang S., Mei Y., Li X., Tan T. Preparation of high efficiency hollow  $\text{TiO}_2$  nanospheres for electrophoretic displays. — *Materials Letters*, 2012, **74**, 1.
101. Liu L., Isobe T., Ling H., Okada K., Nakajima A. Processing and photocatalytic properties of Cu-grafted  $\text{TiO}_2$  powder from acid treated  $\text{BaTiO}_3$ . — *Materials Research Bulletin*, 2011, **46**, 175.
102. Yamamoto N., Isobe T., Matsushita S., Nakajima A. Preparation and visible-light photocatalytic activity of Cu-grafted rutile fine powder from selective leaching of  $\text{BaTiO}_3$ . — *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 2012, **120**, 483.
103. Jiang P.J., Wynn-Jones G., Grover L.M. A calcium phosphate cryogel for alkaline phosphatase encapsulation. — *Journal of Materials Science*, 2010, **45**, 5257.

104. Ekren N., Gunduz O., Celik S., Ayata B., Y.M. Sahin, Chou J., Ben-Nissan B., Salman S., Gökçe H., Oktar F. N. Production of apatite from snail shells for biomedical engineering applications. — *Key Engineering Materials*, 2016, **696**, 51.
105. Girija E.K., Suresh Kumar G., Thamizhavel A., Yokogawa Y., Narayana Kalkura S. Role of material processing on the thermal stability and sinterability of nanocrystalline hydroxyapatite. — *Powder Technology*, 2012, **225**, 190.
106. Winnett J., Mallick K.K. Porous 3D bioscaffolds by adaptive foam reticulation. — *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, 2015, **4**, 4.
107. Cheng Z., Zhao K., Wu Z.P. Structure control of hydroxyapatite ceramics via an electric field assisted freeze casting method. — *Ceramics International*, 2015, **41**, 8599.
108. Bai H., Wang D.,<sup>1</sup> Delattre B., Gao W, De Coninck J., Li S., Tomsia A.P. Biomimetic gradient scaffold from ice-templating for self-seeding of cells with capillary effect. — *Acta Biomaterialia*, 2015, **20**, 113.
109. Sun T.-W., Zhu Y.-J., Chen F., Chen F.-F., Jiang Y.-Y., Zhang Y.-G., Wu J. Ultralong hydroxyapatite nanowires/collagen scaffolds with hierarchical porous structure, enhanced mechanical properties and excellent cellular attachment. — *Ceramics International*, 2017, **43**, 15747.
110. Indrani D.J., Budiyo E., Hayun H. Preparation and characterization of porous hydroxyapatite and alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. — *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 2017, **9**, 98.
111. Iqbal H, Ali M., Zeeshan R., Mutahir Z., Iqbal F., Hayat Nawaz M.A., Shahzadi L., Aqif Anwar Chaudhry A.A., Yar M., Luan S., Farooq Khan A., Rehman I. Chitosan/hydroxyapatite (HA)/hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) spongy scaffolds-synthesis and evaluation as potential alveolar bone substitutes. — *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, **160**, 553.
112. Kawashita M., Matsui N., Li Z., Miyazaki T., Kanetaka H. Preparation, structure, and in vitro chemical durability of yttrium phosphate microspheres for intra-arterial radiotherapy. — *Journal of the Biomedical Materials Research B*, 2011, **99**, 45.
113. Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А., Панфилова Е.В., Пылаев Т.Е., Бибикова О.А., Староверов С.А., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. Новые типы наноматериалов: порошки золотых наносфер, наностержней, нанозвезд и золото-серебряных наноклеток. — *Российские нанотехнологии*, 2012, **7**, 73.
114. Khlebtsov B.N., Panfilova E.V., Terentyuk G.S., Maksimova I.L., Ivanov A.V., Khlebtsov N.G. Plasmonic nanopowders for photothermal therapy of tumors. — *Langmuir*, 2012, **28**, 8994.
115. Xie J., Lee J.Y., Wang D.I.C. Seedless, surfactantless, high-yield synthesis of branched gold nanocrystals in HEPES buffer solution. — *Chemistry of Materials*, 2007, **19**, 2823.
116. Jung H.S., Shin H., Kim J.R., Kim J.Y., Hong K.S., Lee J.K. In Situ Observation of the stability of anatase nanoparticles and their transformation to rutile in an acidic solution. — *Langmuir*, 2004, **20**, 11732.
117. Shin H., Jung H.S., Hong K.S., Lee J.K. Crystal phase evolution of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with reaction time in acidic solutions studied via freeze-drying method. — *Journal of Solid State Chemistry*, 2005, **178**, 15.
118. Chiavacci L.A., Santilli C.V., Pulcinelli S.H., Bourgaux .C, Briois V. Role of the surface state and structural feature in the thermoreversible sol-gel transition of a zirconyl aqueous precursor modified by sulfuric acid. — *Chemistry of Materials*, 2004, **16**, 3995.
119. Kaluza S., Muhler M. On the Role of aging, washing, and drying in the synthesis of polycrystalline zinc oxide by precipitation: combining fast continuous mixing, spray drying and freeze drying to unravel the solid-state transformations of the precipitate. — *Catalysis Letters*, 2009, **129**, 287.

120. Sanchez-Enriquez J., Reyes-Gasga J. Obtaining  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , monocalcium phosphate monohydrate, via monetite from brushite by using sonication. — *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, **20**, 948.
121. Kim S., Ryu H.S., Shin H., Jung H.S., Hong K.S. In situ observation of hydroxyapatite nanocrystal formation from amorphous calcium phosphate in calcium-rich solutions. — *Materials Chemistry and Physics*, 2005, **91**, 500.
122. Dourbash F.A., Alizadeh P. Organosilane modified bioactive glass/poly (amido amine) generation 5 hybrids: Effect of solvent and synthesis route on structural properties, thermal stability and apatite formation. — *Materials Chemistry and Physics*, 2017, **202**, 104.
123. Choimet M., Kim H.-M., Oh J.-M., Tourrette A., Drouet C. Nanomedicine: Interaction of biomimetic apatite colloidal nanoparticles with human blood components. — *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2016, **145**, 87.
124. Millot N., Xin B., Pighini C., Aymes D. Hydrothermal synthesis of nanostructured inorganic powders by a continuous process under supercritical conditions. — *Journal of the European Ceramic Society*, 2005, **25**, 2013.
125. Kim S.J., Lee K., Kim J.H., Lee N.H., Kim S.J. Preparation of brookite phase  $\text{TiO}_2$  colloidal sol for thin film coating. — *Materials Letters*, 2006, **60**, 364.
126. Yang H., Ouyang J., Tang A. Single step synthesis of high-purity CoO nanocrystals. — *Journal of Physical Chemistry B*, 2007, **111**, 8006.
127. Boldrin P., Hebb A.K., Chaudhry A.A., Otley L., Thiebaut B., Bishop P., Darr J.A. Direct synthesis of nanosized  $\text{NiCo}_2\text{O}_4$  spinel and related compounds via continuous hydrothermal synthesis methods. — *Industrial Engineering Chemistry Research*, 2007, **46**, 4830.
128. Nalbandian L., Delimitis A., Zaspalis V.T., Deliyanni E.A., Bakoyannakis D.N., Peleka E.N. Hydrothermally prepared nanocrystalline Mn-Zn ferrites: synthesis and characterization. — *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008, **114**, 465.
129. Zhang Z., Brown S., Goodall J.B.M., Weng X., Thompson K., Gong K., Kellici S., Clark R.J.H., Evans J.R.G., Darr J.A. Direct continuous hydrothermal synthesis of high surface area nanosized titania. — *Journal of Alloys and Compounds*, 2009, **476**, 451.
130. Kim S.J., Yun Y.U., Oh H.J., Hong S.H., Roberts C.A., Routray K., Wachs I.E. Characterization of hydrothermally prepared titanate nanotube powders by ambient and *in situ* Raman spectroscopy. — *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2010, **1**, 130.
131. Szepesi C.J., Cantornet J., Allen Kimel R., Adair J.H. A Critical Assessment of nanometer scale zirconia green body formation by pressure filtration and uniaxial compaction. — *Journal of the American Ceramic Society*, 2011, **94**, 4200.
132. Long Y., Hui J., Wang P., Hu S., Xu B., Xiang G., Zhuang J., Lu X., Wang X.  $\alpha$ - $\text{MnO}_2$  nanowires as building blocks for the construction of 3D macro-assemblies. — *Chemical Communications*, 2012, **48**, 5925.
133. Gamarra L.F., Brito G.E.S., Pontuschka W.M., Amaro E., Parma A.H.C., Goya G.F. Biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for contrast agents: a structural and magnetic study. — *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, **289**, 439.
134. Frandsen C., Morup S. Reversible aggregation and magnetic coupling of  $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles. — *Journal of Physics Condensed Matter*, 2006, **18**, 7079.
135. Arelaro A.D., Brandl A.L., Lima E., Gamarra L.F., Brito G.E.S., Pontuschka W.M., Goya G.F. Interparticle interactions and surface contribution to the effective anisotropy in biocompatible iron oxide nanoparticles used for contrast agents. — *Journal of Applied Physics*, 2005, **97**, 10J316.
136. Ludwig F., Heim E., Menzel D., Schilling M. Investigation of superparamagnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles by fluxgate magnetorelaxometry for use in magnetic relaxation immunoassays. — *Journal of Applied Physics*, 2006, **99**, 08P106.



137. Ludwig F., Heim E., Schilling M. Characterization of superparamagnetic nanoparticles by analyzing the magnetization and relaxation dynamics using fluxgate magnetometers. — *Journal of Applied Physics*, 2007, **101**, 113909.
138. Ludwig F., Heim E., Schilling M. Characterization of magnetic core-shell nanoparticles by fluxgate magnetorelaxometry, ac susceptibility, transmission electron microscopy and photon correlation spectroscopy—A comparative study. — *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2009, **321**, 1644.
139. Schmidl F., Weber P., Koettig T., Buttner M., Prass S., Becker C., Mans M., Heinrich J., Roder M., Wagner K., Berkov D.V., Goernert P., Glockl G., Weitschies W., Seidel P. Characterization of energy barrier and particle size distribution of lyophilized ferrofluids by magnetic relaxation measurements. — *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007, **311**, 171.
140. Candelario V.M., Guiberteau F., Moreno R., Ortiz A.L. Aqueous colloidal processing of submicrometric SiC plus  $Y_3Al_5O_{12}$  with diamond nanoparticles. — *Journal of the European Ceramic Society*, 2013, **33**, 2473.
141. Chubilleau C., Lenoir B., Masschelein P., Dauscher A., Candolfi C., Guilmeau E., Godart C. High temperature thermoelectric properties of  $CoSb_3$  skutterudites with PbTe inclusions. — *Journal of Materials Science*, 2013, **48**, 2761.
142. Teagarden D.L., Baker D.S. Practical aspects of lyophilization using non-aqueous co-solvent systems. — *European Journal of Pharmaceutical Science*, 2002, **15**, 115.
143. Schaefer J., Rasmussen D.H., Partch R. Freeze drying of aluminum nanoflakes from cyclohexane suspensions. — *Drying Technology*, 2013, **31**, 856.
144. Degiong Z., Shuming P., Xiaojun C., Xiaoling G., Tongzai Y. Fabrication and characterization of  $Li_3TaO_4$  ceramic pebbles by wet process. — *Journal of Nuclear Materials*, 2010, **396**, 245.
145. Jerndal E., Mattisson T., Lyngfelt A. Investigation of different NiO/ $NiAl_2O_4$  particles as oxygen carriers for chemical-looping combustion. — *Energy&Fuels*, 2009, **23**, 665.
146. Garcia E., Mesquita-Guimaraes J., Miranzo P., Osendi M.I. Porous mullite and mullite-ZrO<sub>2</sub> granules for thermal spraying applications. — *Surface and Coating Technology*, 2011, **205**, 4304.
147. Vicent M., Sanchez E., Molina T., Nieto I., Moreno R. Comparison of freeze drying and spray drying to obtain porous nanostructured granules from nanosized suspensions. — *Journal of the European Ceramic Society*, 2012, **32**, 1019.
148. Olhero S.M., Ganesh I., Torres P.M.C., Alves F.J., Ferreira J.M.F. Aqueous colloidal processing of ZTA composites. — *Journal of the American Ceramic Society*, 2009, **92**, 9.
149. Mavrodinova V., Popova M., Valchev V., Nickolov R., Minchev Ch. Beta zeolite colloidal nanocrystals supported on mesoporous MCM-41. — *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, **286**, 268.
150. Tamon H., Ishizaka H. Preparation of organic mesoporous gel by supercritical/freeze drying. — *Drying Technology*, 1999, **17**, 1653.
151. Tamon H., Ishizaka H., Yamamoto T., Suzuki T. Preparation of mesoporous carbon by freeze drying. — *Carbon*, 1999, **37**, 2049.
152. Tamon H., Ishizaka H., Yamamoto T., Suzuki T. Influence of freeze-drying conditions on the mesoporosity of organic gels as carbon precursors. — *Carbon*, 2000, **38**, 1099.
153. Szczurek A., Amaral-Labat G., Fierro V., Pizzi A., Celzard A. Bimodal activated carbons derived from resorcinol-formaldehyde cryogels. — *Science and Technology of Advanced Materials*, 2011, **12**, 035001.
154. Czakkel O., Marthi K., Geissler E., Laszlo K. Influence of drying on the morphology of resorcinol-formaldehyde-based carbon gels. — *Microporous and Mesoporous Materials*, 2005, **86**, 124.

155. *Feaver A., Cao G.* Activated carbon cryogels for low pressure methane storage. — *Carbon*, 2006, **44**, 590.
156. *Alvares Rodrigues L., Parmentier J., Parra J.B., Thim G.P.* Preparation of nodular carbon cryogel from simple and inexpensive polycondensation reaction of commercial modified black wattle tannin. — *Journal of Sol Gel Science and Technology*, 2013, **67**, 519.
157. *Kraiwattanawong K., Mukai S.R., Tamon H., Lothongkum A.W.* Preparation of carbon cryogels from wattle tannin and furfural. — *Microporous and Mesoporous Materials*, 2007, **98**, 258.
158. *Kraiwattanawong K., Mukai S.R., Tamon H., Lothongkum A.W.* Control of mesoporous properties of carbon cryogels prepared from wattle tannin and furfural. — *Journal of Porous Materials*, 2008, **15**, 695.
159. *Kraiwattanawong K., Mukai S.R., Tamon H., Lothongkum A.W.* Improvement of mesoporosity of carbon cryogels by acid treatment of hydrogels. — *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008, **115**, 432.
160. *Amaral-Labat G., Szczurek A., Fierro V., Stein N., Boulanger C., Pizzi A., Celzard A.* Pore structure and electrochemical performances of tannin-based carbon cryogels. — *Biomass and Bioenergy*, 2012, **39**, 274.
161. *Arbizzani C., Beninati S., Manfredi E., Soavi F., Mastragostino M.* Electrodeposited PtRu on cryogel carbon-Nafion supports for DMFC anodes. — *Journal of Power Sources*, 2006, **161**, 826.
162. *Arbizzani C., Beninati S., Soavi F., Varzi A., Mastragostino M.* Supported PtRu on mesoporous carbons for direct methanol fuel cells. — *Journal of Power Sources*, 2008, **185**, 615.
163. *Babic V.M., Vracar L.M., Radmilovic V., Krstajic N.V.* Carbon cryogel as support of platinum nano-sized electrocatalyst for the hydrogen oxidation reaction. — *Electrochimica Acta*, 2006, **51**, 3820.
164. *Elezovic N.R., Babic B.M., Krstajic N.V., Gajic-Krstajic L.M., Vracar L.M.* Specificity of the UPD of H to the structure of highly dispersed Pt on carbon support. — *International Journal of Hydrogen Energy*, 2007, **32**, 1991.
165. *Babic V.M., Kaluderovic B.V., Vracar L.M., Radmilovic V., Krstajic N.V.* Characterization of surface modified carbon cryogel and carbon supported Pt catalyst. — *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2007, **72**, 773.
166. *Horikawa T., Sekida T., Hayashi J., Katoh M., Do D.D.* A new adsorption-desorption model for water adsorption in porous carbons. — *Carbon*, 2011, **49**, 416.
167. *Yamamoto T., Kataoka S., Ohmori T.* Characterization of carbon cryogel microspheres as adsorbents for VOC. — *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **177**, 331.
168. *Kim S.I., Yamamoto T., Endo A., Ohmori T., Nakaiwa M.* Adsorption of phenol and reactive dyes from aqueous solution on carbon cryogel microspheres with controlled porous structure. — *Microporous and Mesoporous Materials*, 2006, **96**, 191.
169. *García B.B., Feaver A.M., Zhang Q., Champion R.D., Cao G., Fister T.T., Nagle K.P., Seidler G.T.* Effect of pore morphology on the electrochemical properties of electric double layer carbon cryogel supercapacitors. — *Journal of Applied Physics*, 2008, **104**, 014305.
170. *Garcia B.B., Candelaria S.L., Liu D., Sepheri S., Cruz J.A., Cao G.* High performance high-purity sol-gel derived carbon supercapacitors from renewable sources. — *Renewable Energy*, 2011, **36**, 1788.
171. *Arbizzani C., Beninati S., Lazzari M., Soavi F., Mastragostino M.* Electrode materials for ionic liquid-based supercapacitors. — *Journal of Power Sources*, 2007, **174**, 648.
172. *Candelaria S.L., Garcia B.B., Liu D., Cao G.* Nitrogen modification of highly porous carbon for improved supercapacitor performance. — *Journal of Materials Chemistry*, 2012, **22**, 9884.

173. *Candelaria S.L., Chen R., Jeong Y.H., Cao G.* Highly porous chemically modified carbon cryogels and their coherent nanocomposites for energy applications. — *Energy and Environmental Science*, 2012, **5**, 5619.
174. *Song M.S., Nahm S., Oh Y.J.* Preparation and electrochemical properties of carbon cryogel for supercapacitor. — *Journal of the Korean Ceramic Society*, 2008, **45**, 662.
175. *Kraiwattanawong K., Sano N., Tamon H.* Capacitive performance of binder-free carbon/carbon composite cryogels. — *Microporous and Mesoporous Materials*, 2013, **165**, 228.
176. *Pan A., Liu D., Zhou X., Garcia B.B., Liang S., Liu J., Cao G.* Enhanced lithium-ion intercalation properties of coherent hydrous vanadium pentoxide-carbon cryogel nanocomposites. — *Journal of Power Sources*, 2010, **195**, 3893.
177. *Zhang M., Li Y., Uchaker E., Candelaria S., Shen L., Wang T., Cao G.* Homogenous incorporation of SnO<sub>2</sub> nanoparticles in carbon cryogels via the thermal decomposition of stannous sulfate and their enhanced lithium-ion intercalation properties. — *Nano Energy*, 2013, **2**, 769.
178. *Kraiwattanawong K., Sano N., Tamon H.* Low-cost production of mesoporous carbon/carbon composite cryogels. — *Carbon*, 2011, **49**, 3404.
179. *Kraiwattanawong K., Sano N., Tamon H.* Carbon tunnels formed in carbon/carbon composite cryogels. — *Microporous and Mesoporous Materials*, 2012, **153**, 47.
180. *Babic B., Kokunesoski M., Miljkovic M., Prekajski M., Matovic B., Gulicovski J., Bucevac D.* Synthesis and characterization of the SBA-15/carbon cryogel nanocomposites. — *Ceramics International*, 2012, **38**, 4875.
181. *Markovic Z.M., Babic B.M., Dramicanin M.D., Holclajtner Antunovic I.D., Pavlovic V.B., Perusko D.B., Todorovic Markovic B.M.* Preparation of highly conductive carbon cryogel based on pristine grapheme. — *Synthetic Metals*, 2012, **162**, 743.
182. *Editorial.* All in the graphene family — A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials. — *Carbon*, 2013, **65**, 1.
183. *Zhang X., Sui Z., Xu B., Yue S., Luo Y., Zhan W., Liu B.* Mechanically strong and highly conductive grapheme aerogel and its use as electrodes for electrochemical power sources. — *Journal of Materials Chemistry*, 2011, **21**, 6494.
184. *Wu T., Chen M., Zhang L., Xu X., Liu Y., Yan J., Wang W., Gao J.* Three-dimensional graphene-based aerogels prepared by a self-assembly process and its excellent catalytic and absorbing performance. — *Journal of Materials Chemistry A*, 2013, **1**, 7612.
185. *Cao Y., Feng J., Wu P.* Preparation of organically dispersible graphene nanosheet powders through a lyophilization method and their poly(lactic acid) composites. — *Carbon*, 2010, **48**, 3834.
186. *Yang X.W., He Y.S., Liao X.Z., Ma Z.F.* Improved graphene film by reducing restacking for lithium ion battery applications. — *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2011, **27**, 2583.
187. *Ning G., Xu C., Mu L., Chen G., Wang G., Gao J., Fan Z., Qian W., Wei F.* High capacity gas storage in corrugated porous graphene with a specific surface area-lossless tightly stacking manner. — *Chemical Communications*, 2012, **48**, 6815.
188. *Oyer A.J., Carillo J.M.Y., Hire C.C., Schniepp H.C., Asandei A.D., Dobrynin A.V., Adamson D.H.* Stabilization of graphene sheets by a structured benzene/hexafluorobenzene mixed solvent. — *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 5018.
189. *Leenaerts O., Partoens E., Peeters F.M.* Water on graphene: hydrophobicity and dipole moment using density functional theory. — *Physical Review B*, 2009, **79**, 235440.
190. *Mi X., Huang G., Xie W., Wang W., Liu Y., Gao J.* Preparation of graphene oxide aerogel and its adsorption for Cu<sup>2+</sup> ions. — *Carbon*, 2012, **50**, 4856.
191. *He Y., Zhang N., Wu F., Xu F., Liu Y., Gao J.* Graphene oxide foams and their excellent adsorption ability for acetone gas. — *Materials Research Bulletin*, 2013, **48**, 3553.

192. *Ma J., Wang X., Liu Y., Wu T., Liu Y., Guo Y., Li R., Sun X., Wu F., Li C., Gao J.* Reduction of graphene oxide with L-lysine to prepare reduced graphene oxide stabilized with polysaccharide polyelectrolyte. — *Journal of Materials Chemistry A*, 2013, **1**, 2192.
193. *Dhakshinamoorthy A., Alvaro M., Concepcion P., Fornes V., Garcia H.* Graphene oxide as an acid catalyst for the room temperature ring opening of epoxides. — *Chemical Communications*, 2012, **48**, 5443.
194. *He Y., Zhang N., Long Y., Sun H., Qiu H., Gao J.* Study on the catalytic activity of graphene oxide. — *Advanced Materials Research*, 2012, **430-432**, 488.
195. *He Y., Zhang N., Gong Q., Li Z., Gao J., Xiu H.* Metal nanoparticles supported graphene oxide 3D porous monoliths and their excellent catalytic activity. — *Materials Chemistry and Physics*, 2012, **134**, 585.
196. *Maugey M., Neri W., Zakri C., Derre A., Penicaud A., Noe L., Chorro M., Launois P., Monthieux M., Poulin P.* Substantial improvement of nanotube processability by freeze-drying. — *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2007, **7**, 2633.
197. *Kim T.H., Doe C., Kline S.R., Choi S.M.* Water-redispersible isolated single-walled carbon nanotubes fabricated by in situ polymerization of micelles. — *Advanced Materials*, 2007, **19**, 29.
198. *Meng Z., Wu D., Wang L., Zhu H., Li Q.* Carbon nanotube glycol nanofluids: photo-thermal properties, thermal conductivities and rheological behavior. — *Particuology*, 2012, **10**, 614.
199. *Taquahashi Y., Ogawa Y., Takagi A., Tsuji M., Morita K., Kanno J.* An improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. — *Journal of Toxicological Science*, 2013, **38**, 619.
200. *Yun Y.S., Bak H., Jin H.J.* Porous carbon nanotube electrodes, supported by natural polymeric membranes for PEMFC. — *Synthetic Metals*, 2010, **160**, 561.
201. *Nakagawa K., Thongprachan N., Charinpanitkul T., Tanthapanichakoon W.* Ice crystal formation in the carbon nanotube suspension: A modelling approach. — *Chemical Engineering Science*, 2010, **65**, 1438.
202. *Nakagawa K., Yasumura Y., Thongprachan N., Noriaki Sano N.* Freeze-dried solid foams prepared from carbon nanotube aqueous suspension: Application to gas diffusion layers of a proton exchange membrane fuel cell. — *Chemical Engineering and Processing — Process Intensification*, 2011, **50**, 22.
203. *Bryning M.B., Milkie D.E., Islam M.F., Hough L.A., Kikkawa J.M., Yodh A.G.* Carbon nanotube aerogels. — *Advanced Materials*, 2007, **19**, 661.
204. *Anoshkin I.V., Campion J., Lioubtchenko D.V., Oberhammer J.* Freeze-dried carbon nanotube aerogels for high-frequency absorber applications. — *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2018, **10**, 19806.
205. *Liang L., Liu H., Yang W.* Fabrication of VO<sub>2</sub>(B) hybrid with multiwalled carbon nanotubes to form a coaxial structure and its electrochemical capacitance performance. — *Journal of Alloys and Compounds*, 2013, **559**, 167.
206. *Zhou X., Yin Y.X., Wan L.J., Guo Y.G.* Facile synthesis of silicon nanoparticles inserted into graphene sheets as improved anode materials for lithium-ion batteries. — *Chemical Communications*, 2012, **48**, 2198.
207. *Xin X., Yao X., Zhang Y., Liu Z., Xu X.* Si/C nanocomposite anode materials by freeze-drying with enhanced electrochemical performance in lithium-ion batteries. — *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2012, **16**, 2733.
208. *Jiang X., Yang X., Zhu Y., Shen J., Fan K., Li C.* In situ assembly of graphene sheets-supported SnS<sub>2</sub> nanoplates into 3D macroporous aerogels for high-performance lithium ion batteries. — *Journal of Power Sources*, 2013, **237**, 178.

209. *You B., Wang L., Yao L., Yang J.* Three dimensional N-doped graphene–CNT networks for supercapacitor. — *Chemical Communications*, 2013, **49**, 5016.
210. *Michálek M., Sedláček J., Párchovianský M., Michálková M., Galusek D.* Mechanical properties and electrical conductivity of alumina/MWCNT and alumina/zirconia/MWCNT composites. — *Ceramics International*, 2014, **40**, 1289.
211. *Guiderdoni C., Estournes C., Peigney A., Weibel A., Turq V., Laurent C.* The preparation of double-walled carbon nanotube/Cu composites by spark plasma sintering, and their hardness and friction properties. — *Carbon*, 2011, **49**, 4535.
212. *Khaleghi E., Torikachvili M., Meyers M.A., Olevsky E.A.* Magnetic enhancement of thermal conductivity in copper–carbon nanotube composites produced by electroless plating, freeze drying, and spark plasma sintering. — *Materials Letters*, 2012, **79**, 256.
213. *Mesgar A.S., Mohammadi Z., Khosrovan S.* Improvement of mechanical properties and in vitro bioactivity of freeze-dried gelatin/chitosan scaffolds by functionalized carbon nanotubes. — *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2018, **67**, 267.
214. *Trakhtenberg L.I., Gerasimov G.N.* Metal containing polymers: cryochemical synthesis, structure and physico-chemical properties. 37-74. — in *Metal/Polymer Nanocomposites/* Edited by G. Carotenuto & L. Nicolais. N.-Y.: John Wiley & Sons Inc., 2005. — 302 p.
215. *Gerasimov G.N., Trakhtenberg L.I.* Vapor deposited composite films consisting of dielectric matrix with metal/semiconductor nanoparticles. 456-503. — in *Physico-Chemical Phenomena in Thin Films and at Solid Surfaces.* / Edited by L.I. Trakhtenberg, S.H. Lin and O.J. Ilegbusi. — Amsterdam.: Elsevier Inc., 2007. — 788 p.
216. *Sergeev G.B.* Cryochemistry of metal nanoparticles. — *Journal of Nanoparticle Research*, 2003, **5**, 529.
217. *Сергеев Г.Б.* Нанохимия. Москва, Университет, 2007. — 336 с.

## Глава 8

# Наночастицы серебра: синтез, биологическое действие на бактерии и высшие растения

*Кудринский А.А.<sup>1,2</sup>, Кондаков С.Э.<sup>1,3</sup>, Крутяков Ю.А.<sup>1,2</sup>*

О биологической активности металлического серебра и его соединений известно с античных времен. Этот элемент не относится к эссенциальным, но способен оказывать заметное влияние на протекание многих физиологических процессов в живых организмах [1–5]. Наночастицы (НЧ) серебра обладают высокой биологической активностью в отношении всех живых объектов, начиная от вирусных частиц и заканчивая организмом человека. Растущее с каждым годом количество работ, посвященных изучению антивирусной и антибактериальной активности НЧ серебра, лишний раз доказывает наличие повышенного интереса исследователей к этой проблеме, как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения.

В небольших концентрациях серебро безопасно для человеческих клеток, но губительно для большинства бактерий и вирусов. Благодаря этому серебро получило широкое распространение для обеззараживания воды и пищи в быту и в борьбе с инфекциями при лечении людей [6]. К настоящему времени уникальные антимикробные и антивирусные свойства соединений серебра всесторонне изучены [7–14], и этому вопросу посвящено несколько обзоров [15–17]. Считается маловероятным, что различные микроорганизмы в процессе мутаций могут вырабатывать резистентность к серебру, кроме тех случаев, когда она существует изначально. Это свойство стало особенно актуальным для поиска новых биологически активных соединений-кандидатов в лекарственные средства, так как в настоящее время обнаруживается все большее количество штаммов болезнетворных микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам узкого и широкого спектра действия и представляющих большую угрозу для жизни и здоровья людей [18].

Биологическое действие металлического серебра связано с его медленным окислением и высвобождением ионов  $\text{Ag}^+$  в окружающую сре-

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет

<sup>2</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

<sup>3</sup> Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»

ду. В этой связи представляется перспективным использование препаратов наносеребра как особого класса терапевтических агентов. НЧ серебра обладают большой антибактериальной эффективностью благодаря своей развитой поверхности, обеспечивающей максимальный контакт с окружающей средой. Кроме того, они достаточно малы, чтобы проникать через поры клеточных мембран и влиять на внутриклеточные процессы изнутри.

Начиная с 90-х годов XX века, прогресс в разработке методов синтеза НЧ серебра повлек за собой все более широкое использование наносеребра в медицине, промышленности и быту в качестве антибактериального агента [19–23]. Это, в свою очередь, привело к поступлению все больших количеств этих наноматериалов в окружающую среду и обусловило резкий всплеск интереса к изучению поведения НЧ серебра в живой и неживой природе.

Кроме того, обнаружение уникального ростостимулирующего действия определенных доз коллоидного серебра [24–29] в сочетании с его способностью активизировать систему фитоиммунитета за счет индуцирования окислительного стресса [24, 30–32] — одного из способов борьбы растений с фитопатогенами — открыло возможности использования наноматериалов на основе металлического серебра и потребовало пристального внимания к поведению таких наносистем в организме растений.

## 8.1. Химический синтез сферических НЧ серебра

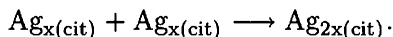
Наиболее распространенные химические методы синтеза дисперсий НЧ серебра основаны на восстановлении солей серебра в присутствии стабилизаторов — веществ, способных сорбироваться на поверхности серебра и предотвращать неконтролируемый рост и агрегацию частиц. Синтез НЧ с использованием стабилизаторов позволяет гибко сочетать уникальные свойства наноразмерного металла и специфические свойства привитого поверхностного слоя, а также позволяет получать частицы, коллоидно-химические и биологические свойства которых максимально подходят для решения прикладных задач.

### Цитратный метод (метод Туркевича)

Метод получения НЧ серебра размером 60–200 нм путем восстановления водного раствора нитрата серебра цитратом натрия при кипячении впервые был описан в работе [33]. Отличительной чертой цитратного метода, иногда называемого методом Туркевича, является то, что в процессе образования металлических НЧ цитрат-анион выступает одновременно в качестве восстановителя и стабилизирующего агента. Это осложняет подбор его оптимальной концентрации в реакции, так как ее изменение одновременно сказывается как на скорости восстановления, так и на процессах роста и нуклеации частиц.

Для выяснения стабилизирующей роли цитрат-аниона восстановление соли металла проводили при помощи гамма-радиолиза ( $^{60}\text{Co}$   $9,3 \times 10^4$  Рад/час) водного раствора 2-пропанола, содержащего  $\text{N}_2\text{O}$  и  $\text{AgClO}_4$ , где в качестве восстановителя выступали гидроксильные радикалы, образующиеся *in situ*, а сам цитрат в этом восстановлении не участвовал [34]. Было установлено, что при низких и высоких концентрациях цитрата ( $5 \times 10^{-5}$  М и  $1,5 \times 10^{-3}$  М соответственно) образуются крупные и дефектные агломераты серебра диаметром 15–30 нм; напротив, при промежуточной концентрации стабилизатора, равной  $(1-5) \times 10^{-4}$  М, получаются сферические НЧ с довольно узким распределением по размерам (диаметром 8–11 нм). В силу достаточно высокого электрохимического потенциала перехода  $\text{Ag}^+/\text{Ag}^0$  ( $E^0 = 0,799$  В) реакция восстановления протекает относительно медленно, но ее скорости все же достаточно для того, чтобы успешно конкурировать с реакциями гашения гидроксильных радикалов в растворе при установленной дозе облучения [35]. Все это позволило предложить несколько механизмов роста НЧ серебра при цитратном способе получения (рис. 8.1).

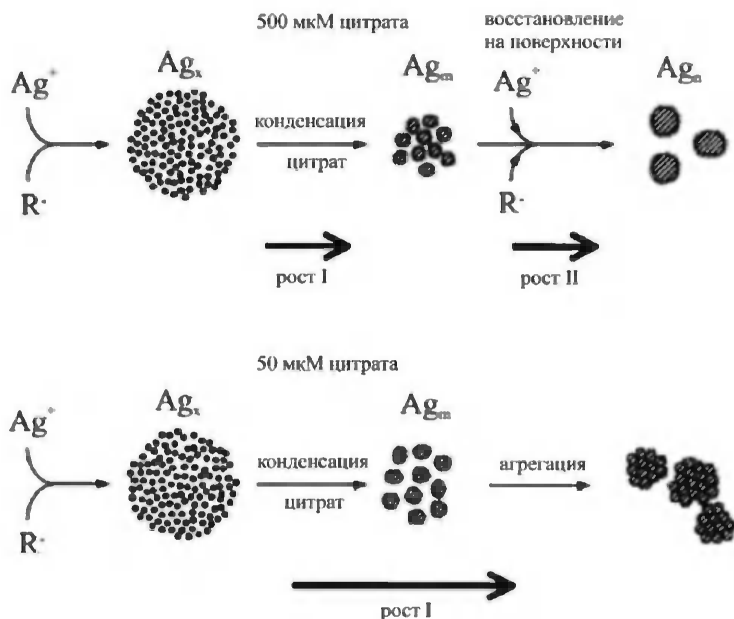
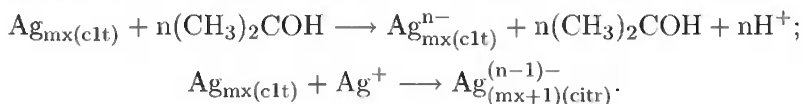
На начальном этапе восстановления происходит образование кластеров  $\text{Ag}_2^+$ ,  $\text{Ag}_4^+$ ,  $\text{Ag}_9^+$  ( $\text{Ag}_x$  в общем виде), структура которых была подтверждена масс-спектральными исследованиями [36]. В момент образования кластеры  $\text{Ag}_x$  взаимодействуют с цитратом, и после этого происходит их объединение в более крупные частицы:



При достижении критического размера (50–100 атомов или 1–1,5 нм) рост кластеров по механизму конденсации практически прекращается, и, если концентрация цитрата невелика, его стабилизирующего действия оказывается недостаточно, чтобы препятствовать процессу их агрегации, ведущему к образованию НЧ с большим диаметром. В случае высокой концентрации цитрата величина ионной силы раствора становится критической для дестабилизации цитратного слоя, что также ведет к агломерации. В этом случае также осуществляется дальнейшее увеличение размеров



частиц, но по другому механизму, который заключается в росте за счет восстановления ионов серебра на поверхности кластера [37–40]:



**Рис. 8.1.** Альтернативные механизмы роста НЧ серебра, получаемых цитратным способом в зависимости от концентрации цитрат аниона. Обозначения  $\text{Ag}^+$  — катионы соли серебра,  $\text{Ag}_x$  — кластеры серебра ( $< 1$  нм),  $\text{Ag}_m$  — первичные частицы, стабилизированные цитратом (около 1 нм),  $\text{Ag}_n$  — кошечные частицы (8–10 нм),  $\text{R}^*$  — восстанавливающие радикалы, без обозначения — агрегаты наночастиц размером около 20 нм (пояснение в тексте)

Таким образом, стадия формирования зародышевого кластера и его дальнейший рост разделены во времени и осуществляются последовательно. Образующиеся по такому механизму НЧ серебра не склонны к агломерации, имеют сферическую форму и узкое распределение по размерам.

### Боргидридный метод

На сегодняшний день способы восстановления различных соединений серебра боргидридом натрия являются наиболее распространенными в процессах получения НЧ как в гомогенных, так и в гетерогенных системах [41]. Благодаря своей универсальности, относительной простоте исполне-

ния и возможности контроля размера НЧ, методы восстановления боргидридом получили широкое распространение в промышленном производстве наносеребра. Впервые описанный синтез НЧ серебра боргидридным методом состоял в восстановлении охлажденного до 0°С раствора  $\text{AgNO}_3$  шестикратным (мол.) избытком раствора  $\text{NaBH}_4$  при интенсивном перемешивании [42]. Полученный золь имел полосу поглощения плазмонного резонанса с  $\lambda = 400$  нм, а диаметр частиц варьировался в интервале 1–10 нм. В работе [43] сообщается о синтезе НЧ серебра, стабилизированных поливиниловым спиртом (ПВС), для чего проводилось восстановление водного раствора  $\text{AgNO}_3$  в присутствии ПВС 1,2-кратным избытком  $\text{NaBH}_4$ .

Для получения агрегативно устойчивых в течение длительного времени дисперсий НЧ серебра с требуемыми свойствами необходимо вводить тот или иной стабилизатор в процессе их синтеза. Аспекты координационной химии процессов взаимодействия НЧ с молекулами стабилизатора подробно рассмотрены в обзоре [44]. В работе [45] в качестве стабилизатора использовался бис(11-триметиламмонийундеcanoиламиноэтил)дисульфид дибромид, в работе [46] — пептид Cys-Ala-Leu-Asp-Asp и тиоалкилированный полиэтиленгликоль (ПЭГ). Первоначально синтезировали стабилизированные цитратом НЧ по методу [43], которые затем перемодифицировали реакцией лигандного обмена в буферном растворе. Полученные образцы имели высокую стабильность в 1 М растворе  $\text{NaCl}$  в интервале рН 4–12.

Авторы [47] сообщили о получении умеренно полидисперсных водных коллоидных растворов НЧ серебра (2,5–5 нм), стабилизированных 2-меркаптоэтансульфокислотой. Сообщается также [48, 49] о НЧ серебра со средним диаметром 8 нм, стабилизированных натриевой солью 3-меркаптопропансульфокислоты, полученных восстановлением гидрозоля  $\text{AgI}$ . Опубликован способ синтеза НЧ серебра со средним диаметром 17 нм, стабилизированных 3-меркаптопропансульфокислотой [50].

Существенным недостатком большинства методов синтеза в водных средах являются невозможность достижения высоких концентраций серебра в коллоидных растворах (лишь  $< 10^{-4}$  М в пересчете на металл), что связано с их агрегативной неустойчивостью. В этом отношении представляет интерес подход, который заключается в восстановлении концентрированных растворов нитрата серебра боргидридом натрия в присутствии синтетического неорганического материала лаопита [51]. Единственным путем увеличения размеров частиц является рост за счет восстановления ионов серебра на поверхности адсорбированного кластера. Так удается получить раствор  $7,35 \times 10^{-2}$  М (в пересчете на металл) агрегативно устойчивых коллоидных систем, содержащих НЧ серебра (7–10 нм).

## Синтез в двухфазных водно-органических системах

Одной из важных вех в развитии двухфазного водно-органического синтеза наночастиц благородных металлов является работа Бруста и Шиффрина, в которой был впервые описан метод синтеза гидрофобных нанокластеров золота (1–3 нм), стабилизированных самособирающимся (высокоорганизованным, self-assembled) монослоем алкантиола, в двухфазной водно-органической системе [52]. Практически все известные сегодня методики получения серебряных НЧ в двухфазных водно-органических системах основаны на данном подходе и различаются лишь нюансами проведения процесса. Синтез заключается в получении НЧ из реагентов, пространственно разделенных в двух несмешивающихся фазах. Скорость взаимодействия металл-содержащего прекурсора и восстановителя лимитируется поверхностью раздела жидкостей и интенсивностью межфазного переноса реагентов из водной в органическую среду, который осуществляется с помощью четвертичной алкиламмонийной соли. Стабилизация и гидрофобизация образующихся на границе раздела фаз кластеров происходит за счет монослойного покрытия их поверхности алкантиолом, находящимся в неполярной среде, а их перенос в органическую среду — с помощью межфазного агента.

Описанный подход широко применяется для получения органоzeлей металлического серебра [53–55]. Особенность этого метода заключается в том, что частицы золя бромида серебра, образующегося в результате обычного ионного обмена между молекулами переносчика и солью металла, не выпадают в осадок вследствие небольшого размера. Кроме того, частицы AgBr приобретают отрицательный заряд за счет поверхностной адсорбции избыточных бромид-ионов, таким образом становится возможным дальнейший транспорт золя в неполярную среду катионами бромида тетра(н-октил)аммония (практически единственного вещества, используемого в качестве межфазного переносчика в двухфазных водно-органических синтезах наночастиц). Дальнейшее восстановление протекает в соответствии с описанным выше механизмом.

Предложен [56] способ получения НЧ серебра, основанный на разделении процессов получения отрицательно заряженного гидрозоля AgBr и его восстановления до металла. Такой подход стал возможен благодаря развитию специфических методов синтеза коллоидов галогенидов серебра [57]. Как отмечено в [56], толуольный раствор, содержащий золь AgBr, и полученный после экстракции гидрозоля из водной среды молочного цвета, совершенно прозрачен, несмотря на сильно отличающиеся коэффициенты преломления толуола и бромида серебра. Это свидетельствует об

уменьшении размеров частиц AgBr по механизму растворения-осаждения. На протяжении процесса восстановления (стабилизатор 4-бромтиофенол) было зарегистрировано наличие пика поглощения с убывающей во времени интенсивностью и  $\lambda = 516$  нм; на основании [58] установлено, что поглощение на этой длине волны обусловлено частицами, ядро которых состоит из металлического серебра, а оболочка — из субнанометрового слоя бромида. По окончании процесса пик с  $\lambda = 516$  нм исчезает, что является свидетельством полного восстановления бромида серебра и образования металлических НЧ (3,1–5,9 нм). Существенным недостатком метода Бруста-Шиффрина является применение большого количества реагентов, в особенности межфазного переносчика, который способен необратимо загрязнять поверхность образующихся НЧ и, тем самым, препятствовать их использованию в прикладных целях. Большой интерес в этом плане представляет работа [59], в которой НЧ серебра синтезировали из комплекса нитрата серебра с *N*-гексадецилэтилендиамином  $\text{Ag}(\text{hex-en})_2\text{NO}_3\text{H}_2\text{O}$ . Молекула *N*-гексадецилэтилендиамина содержит гидрофобную часть, которая обуславливает растворимость серебряного комплекса в неполярной среде. За счет наличия в молекуле лиганда двух атомов азота с неподеленными парами электронов ставится возможной его координация на поверхности и стабилизация серебряного кластера [60]. Варьируя концентрацию комплекса, можно получать НЧ с различным средним диаметром (от 7 до 14 нм). На использовании *n*-бутиламина в качестве растворителя для нитрата серебра основана работа [61], в которой описано получение монодисперсных НЧ серебра, стабилизированных *n*-додекановой кислотой.

Альтернативой двухфазному методу в синтезе гидрофобных НЧ служит способ их получения в водной среде и последующей экстракцией в неполярную среду, содержащую стабилизатор, в качестве которого может выступать и межфазный переносчик [62].

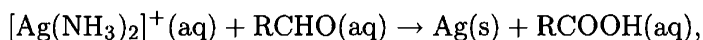
В работе [63] предложен метод гидрофобизации НЧ серебра, первоначально стабилизированных меркаптоянтарной кислотой, путем их количественного переноса в органическую среду с помощью цетилтриметиламмония (ЦТМА) за счет электростатических взаимодействий его молекул с карбоксильными анионами на поверхности НЧ. От избыточного количества ЦТМА в конечном препарате избавлялись его обработкой водным раствором  $\beta$ -циклодекстрина.

Целью [64] являлась разработка нового двухстадийного экстракционного метода получения гидрофильных НЧ серебра, стабилизированных низкомолекулярными органическими гидрофильными лигандами. Схема синтеза заключалась в предварительном получении в двухфазной водно-органической системе гидрофобных НЧ серебра, стабилизированных солями четвертичных аммониевых оснований, и последующей экстракции

НЧ из органической фазы в водный раствор, содержащий гидрофильный стабилизатор. Четвертичные аммониевые соли в процессе образования НЧ одновременно играют роль межфазного переносчика и гидрофобного стабилизатора НЧ.

### Восстановление солей серебра органическими восстановителями

Хорошо известная реакция восстановления серебра, используемая для нанесения тонких серебряных покрытий неэлектрохимическим путем (реакция Толленса), также применяется для получения НЧ серебра [65–71]:



где RCHO — альдегид или углевод.

В работе [65] использовались коммерчески доступные растворы для серебрения, содержащие аммиачный комплекс серебра и формальдегид. Установлена зависимость среднего диаметра синтезируемых НЧ от температуры процесса (~20, ~30, ~40 нм при 27, 30 и 35 °С соответственно). Полученные растворы проявили агрегативную устойчивость в течение длительного времени. Показано, что в качестве восстановителя для получения НЧ серебра небольших размеров (10 нм) фруктоза была лучше глюкозы [66].

Интересный эффект зависимости размеров НЧ серебра от концентрации аммиака и pH в процессе восстановления обнаружен авторами [68]. Для восстановления использовались глюкоза, лактоза, мальтоза и галактоза. Установлено, что оптимальной для синтеза небольших по размеру частиц с умеренной полидисперсностью является невысокая концентрация аммиака в растворе и использование мальтозы в качестве восстановителя, где изменение концентрации  $\text{NH}_3$  от 0,005 М до 0,2 М отражается на увеличении среднего диаметра НЧ от 25 до 260 нм.

В работе [72] в качестве альтернативы гидроксидам щелочных металлов предложены органические амины (пиридин и триэтиламин). Восстановление проводили формальдегидом в водной среде в присутствии поли(N-винил-2-пирролидона) в качестве стабилизатора. Установлено, что при использовании триэтиламина образовывались более крупные НЧ (20–30 нм) по сравнению с пиридином (10–20 нм).

Необычная вариация реакции для получения сферического наноразмерного серебра небольших размеров  $15 \pm 4$  нм, где в процессе синтеза для восстановления применяется экстракт листьев *Aloe vera* предложена [73]. Эти же авторы сообщали о применении экстракта листьев герани для получения НЧ серебра [74].

В качестве других органических восстановителей для получения монодисперсных НЧ серебра в однофазных системах используются метанол [75], этанол [76], этиленгликоль [77], триоктилфосфин [78], N,N-диметилформамид [79], системы триоктилфосфин — триоктилфосфиноксид и олеиновая кислота — олеиламин [80–82].

### Методы синтеза в обратных мицеллах

Методы синтеза в обратных мицеллах основаны на использовании мицеллярных систем, которые представляют собой совокупность наноразмерных химических «реакторов», формирующихся в присутствии поверхностно-активных веществ (ПАВ). Суть синтетического подхода состоит в смешении двух микроэмульсий, содержащих одинаковые количества ПАВ, воды и неполярной фазы, а различие в составе заключается только в компонентах, растворенных в солюбилизированной воде (соль серебра и восстановитель соответственно) [83–112].

Активное развитие способа обратных эмульсий началось около 30 лет назад [83–91]. Предложенный авторами [87, 88] механизм формирования НЧ в обратных мицеллах включает в себя четыре основных стадии: 1) слипание водных пулов сталкивающихся мицелл; 2) химическая реакция между компонентами солюбилизированных растворов; 3) стадия нуклеации; 4) внутримицеллярный рост образовавшегося кластера согласно коагуляционной модели Смолуховского. На процесс формирования и размер НЧ оказывают влияние мольное соотношение вода/углеводород, концентрации ионов металла и восстановителя в мицеллах и тип неполярного растворителя, используемого в качестве дисперсионной среды.

Одними из первых синтез НЧ серебра в обратных мицеллах провели Барникель и Вокаун [92, 93]. Они сообщили о химическом и фотохимическом восстановлении нитрата серебра в присутствии катионных (бромид цетилтриметиламмония) и неионогенных ПАВ. Дисперсии НЧ 5–6 нм,  $\lambda_{max} = 414$  нм были устойчивы на протяжении нескольких недель.

Особенно удобными для синтеза НЧ серебра в обратных микроэмульсиях являются тройные системы типа «углеводород-вода-АОТ» (АОТ — бис(2-этилгексил)сульфосукцинат натрия), в которых, меняя мольное соотношение  $H_2O/AOT$   $W(H_2O/AOT)$ , можно изменять в широких пределах диаметр водного пула «напорерактора». Эти системы зарекомендовали себя как весьма простые и удобные для синтеза НЧ серебра различного диаметра. Когда  $W(H_2O/AOT) \leq 6$ , вся вода в мицелле находится в химически связанном состоянии, при  $W(H_2O/AOT) \geq 15$  радиус водного пула мицеллы  $r_w$  прямо пропорционален количеству содержащейся в ней воды  $r_w = 1,5 W_0$  [94]. Подробнее о свойствах ПАВ, способных к образованию

обратных мицелл, можно узнать в обзоре [95]. Систематическое изучение образования серебряных нанокластеров в тройных системах «углеводород-вода-АОТ» было осуществлено в [96, 97], где в качестве источника серебра и со-ПАВа использовался бис(2-этилгексил)сульфосукцинат серебра.

Еще одной замечательной чертой АОТ является его амфифильность, проявляющаяся в том, что стабилизированные им НЧ способны растворяться как в полярных, так и в неполярных средах.

Простой и эффективный способ получения НЧ серебра, обладающих амфифильными свойствами, предложен Састри [98]. Для этого их синтез проводили в водном растворе АОТ различных концентраций. Полученный гидрофильный материал легко экстрагировался в циклогексан в присутствии каталитических количеств фосфорной кислоты. После испарения растворителя серебряные НЧ были устойчивы в сухом состоянии и одинаково легко редиспергировались как в воду, так и в органические растворители.

Роль фосфорной кислоты окончательно не выяснена. В соответствии с ранее предложенной моделью [99, 100] сделано предположение, что в органической среде стабилизирующий слой состоит из совокупности водородных связей, формируемых полярными группами АОТ и  $H_3PO_4$ , с выступающими наружу гидрофобными радикалами, напротив, в воде сложнэфирные и сульфогруппы взаимодействуют с полярным растворителем, что само по себе является термодинамически оправданным. Подобная перестройка при экстракции определяет двойственную природу частиц.

Авторами [101] изучались механизмы роста НЧ серебра в обратных мицеллах, образованных неионогенным ПАВ Triton X-100 [п-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилполи-(оксиэтиленом) $_n$ ,  $n \sim 9$ ]. Синтез проводили из различных соединений посредством УФ-облучения ( $AgNO_3$ ,  $Ag_2SO_4$ ,  $AgClO_4$ ,  $[Ag(en)]^+$ ,  $[Ag(CN)_2]^-$ ,  $[Ag(NH_3)_2]^+$ ,  $[Ag(edta)]_3^-$ ,  $Ag_2O$ ,  $AgBr$ ,  $AgCl$ ,  $AgOOCN$ ). Были исследованы механизм и кинетика восстановления ионов серебра. Оказалось, что на процесс роста НЧ, possessing автокаталитический характер, заметное влияние оказывает характер прекурсора, определяемый входящим в его состав противоионом/лигандом (рис. 8.2).

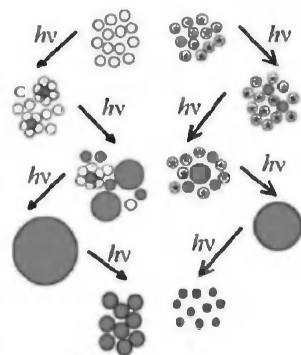


Рис. 8.2. Схематическое изображение различных механизмов роста НЧ серебра под действием света в зависимости от типа выбранного прекурсора: — nanoparticle серебра, образующиеся из соединений типа 1; — nanoparticle серебра, образующиеся из соединений типа 2; — большие нанокластеры серебра (агрегаты); — маленькие нанокластеры серебра

Для получения НЧ серебра в обратных мицеллах был использован ПАВ, состоящий из сдвоенных идентичных амфифильных фрагментов [102], 2-гидрокси-1,3-бис(октадецилдиметиламоний)пропан дибромид. Ранее сообщалось о преимуществах «двойниковых» ПАВ — низком значении критической концентрации мицеллообразования, ярко выраженной биологической активности, повышенной солюбилизующей способности и других [103]. В результате были синтезированы устойчивые на протяжении многих месяцев частицы с довольно узким распределением по размерам  $7,1 \pm 0,9$  нм, эффективно стабилизированные «двойниковым» ПАВ.

С развитием биотехнологических способов получения природных ПАВ [104] появилась возможность их применения в «зеленых» методах синтеза НЧ серебра. Так, в [105, 106] описаны свойства природного ПАВ рамнолипида и его использование для получения серебряных НЧ размером 2–8 нм в обратных мицеллах.

Идейно близкими к направлению синтеза НЧ в обратных мицеллах являются работы, в которых проводилось восстановление серебра в монослоях Лэнгмюра-Блоджетт, где прослеживается аналогия между такими методиками и способами синтеза НЧ в микроэмульсиях [107, 108]. Представляет интерес подход, предложенный в [109], где для получения НЧ серебра использовался монослой Лэнгмюра-Блоджетт  $\pi = 20$  мН/м, нанесенный на поверхность водного раствора  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ . Этот слой образован молекулами витамина Е, выступающего одновременно в качестве восстановителя и стабилизатора. Упорядоченные молекулы  $\alpha$ -токоферола служили центрами нуклеации кластеров, предотвращая их агрегацию. Таким образом, рост отдельной частицы являлся ограниченным и локализованным в одном месте. Использование минимального количества реагентов позволяло получить конечный продукт, не загрязненный примесями.

Ранее отмечалось, что неполярная фаза, выбранная в качестве дисперсионной среды, играет значительную роль в процессе образования НЧ в мицеллах. Это связано с ее влиянием на кинетику интермицеллярного обмена, которое обусловлено различной степенью взаимодействия углеводородных хвостов ПАВ с молекулами растворителя [110, 111]. В свете такого эффекта представляется заманчивым иметь возможность гибкого контроля свойств дисперсионной среды для получения НЧ с заданными параметрами. Известно, что многие характеристики сверхкритических жидкостей и сжатых газов, такие как плотность, коэффициент диффузии, растворяющая способность, сжимаемость, диэлектрическая постоянная и др. можно контролировать с помощью изменения температуры и давления. Эти свойства, в свою очередь, способны влиять на степень интермицеллярного обмена и кинетику роста НЧ. Поэтому сверхкритические



жидкости нашли применение в качестве дисперсионных сред в мицеллярных синтезах.

Синтез наносеребра размером 2–4 нм в обратных мицеллах из АОТ в сверхкритическом пропане впервые был осуществлен в [113, 114]. Принципиально механизм образования и роста НЧ в сверхкритических жидкостях не отличается от процесса в жидких углеводородах при обычных условиях. С целью сравнения размеров получающихся НЧ серебра в [113] были осуществлены их синтезы в обратных мицеллах из АОТ с использованием изооктана, циклогексана и сверхкритического пропана в качестве дисперсионных сред (температура и концентрации реагентов были одинаковы во всех экспериментах, давление циклогексана и изооктана 1 атм, пропана 200 атм). Было установлено, что в сверхкритическом пропане образование НЧ заканчивается за 20 мин, тогда как в циклогексане и изооктане за 50–60 мин, что свидетельствует о высокой скорости интермицеллярного обмена в первом случае, где получались частицы с наименьшим диаметром.

Существенным недостатком жидкого диоксида углерода является его низкая растворяющая способность для большинства ПАВ, в том числе и для АОТ, и неустойчивость микроэмульсий на его основе. Это препятствие было преодолено с появлением и внедрением [115–118] перфторированных карбоксилатных полиэфиров. Авторы [119] впервые сообщили о синтезе НЧ серебра размером 5–15 нм в системе, состоящей из АОТ, перфторированного карбоксилатного полиэфира, воды и сверхкритического  $\text{CO}_2$ . Метод получил развитие в работах [120–124].

## 8.2. Физические методы синтеза сферических наночастиц серебра

Наиболее распространенные химические методы получения НЧ серебра имеют очевидную особенность, которая заключается в присутствии на поверхности НЧ существенного количества примесей от стабилизаторов и восстановителей, использующихся в процессе их синтеза. Однако большинство областей применения НЧ серебра, таких как микроэлектроника, медицина, спектроскопия, катализ, часто несовместимы с наличием даже самых небольших примесей. По этой причине, иногда для специальных прикладных задач используются физические методы получения НЧ серебра, которые позволяют добиваться максимально «чистой» поверхности наноматериалов [125–163].

### Метод лазерной абляции

Синтез НЧ серебра с использованием минимального количества реагентов, а иногда и в чистых растворителях, может быть осуществлен с помощью

лазерной абляции массивных образцов металлического серебра в жидких средах [125–131] или микрочастиц в аэрозолях [132–134].

В работе [131] осуществлен синтез немодифицированных сферических НЧ серебра с логарифмически-нормальным распределением по размерам методом лазерной абляции серебряной пластины ( $\lambda = 1064$  нм, продолжительность импульса 9 нс, мощность  $10$  Дж/см<sup>2</sup>, частота 10 Гц). В ацетонитриле размер частиц составил 1,9 нм, в N,N-ДМФА 2,2 нм, в ТГФ 2,4 нм, в ДМСО 3,9 нм. Из микрофотографий, полученных с помощью просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения, было установлено, что частицы, полученные в ТГФ и ДМСО, покрыты нанометровой оболочкой аморфного углерода, которая в случае ДМСО имеет наибольшую толщину.

Намного раньше серебряные НЧ были получены методом лазерной абляции в водном растворе додецилсульфата патрия [135]. Оказалось, что число образующихся НЧ пропорционально мощности облучения, а их средний размер увеличивается с увеличением мощности лазера и с уменьшением концентрации ПАВ.

Синтез НЧ серебра при лазерном облучении аэрозоля микрочастиц серебра  $1,5 \pm 0,2$  мкм в азоте был описан в работе [132]. Под действием лазерного импульса происходил быстрый разогрев микрочастиц, сопровождающийся испарением металла с их поверхности. В результате образовывались наноматериалы с бимодальным распределением частиц по размерам. Более мелкую фракцию составляли НЧ, образованные в результате конденсации под действием ударных волн, более крупную — частицы, сформированные при конденсации пара в результате первоначального разогрева микрочастиц до их перехода к стадии распада.

### Радиолитические методы

Применение радиолитических методов, основанных на действии электронов или  $\gamma$ -лучей высокой энергии, для синтеза серебряных кластеров, изучения их свойств и механизмов образования началось довольно давно [37, 136–140]. Достижения последних лет показали, что радиолитические методы оказались весьма подходящим и перспективным способом препаративного получения НЧ серебра [141]. Это объясняется возможностью гибкого контроля интенсивности излучения, его дозы и времени экспозиции и, как следствие этого, эффективного управления процессами восстановления в реакционных системах. Пример такого подхода можно найти в [142], где образование кластеров металла происходило в системе, содержащей лишь прекурсор и растворитель. Для восстановления  $\text{AgClO}_4$  в системе вода-этиленгликоль использовали метод импульсного радиолита электро-

нами с энергией 7 МэВ. Найдено, что при увеличении содержания этиленгликоля значительно уменьшается выход НЧ серебра и их средний диаметр, который в случае 1%-ном раствора этиленгликоля в воде составлял 70 нм, в 1%-ном растворе воды в этиленгликоле — 17 нм. Это связало с большим различием в энергии выхода сольватированного электрона в чистой воде и этиленгликоле [143] и в вязкости раствора, что подтверждает, что реакция сольватированных электронов и ионов серебра в чистой воде и этиленгликоле является диффузионно контролируемой [137].

Возможность использования частиц аморфного диоксида кремния в качестве стабилизатора образующихся в результате радиолиза НЧ серебра отражена в [144-147]. Для стабилизации использовали 1%-ную водную суспензию аэросила с удельной поверхностью  $337 \text{ м}^2/\text{г}$  с первичным размером частиц 7 нм [147]. Интересный способ управления размерами частиц предложен авторами работы [148]. Используемый в качестве стабилизатора аминополисахарид хитозан (0,02%-ный раствор в 1%-ной водной уксусной кислоте) подвергали деструкции при действии  $\gamma$ -излучения, причем степень разложения зависела от дозы радиации. При мощности облучения 30 кГр получались НЧ со средним диаметром 4–5 нм, так как в этих условиях полимерные цепи хитозана деструкции практически не подвергались и эффективно стабилизировали образующиеся кластеры. При больших дозах — 100 кГр и выше — происходило образование низкомолекулярных фрагментов разорванных макромолекул хитозана, не способных к эффективной стабилизации, таким образом получали крупные НЧ с широким распределением по размерам.

## Вакуумное испарение металла

НЧ могут быть получены непосредственно из атомарного серебра, образующегося при испарении металла. Процесс испарения может осуществляться как при нагреве в вакууме [149–153], так и при пропускании высокочастотного (800–900 кГц) разряда сквозь слой органического растворителя, содержащего порошок металла [154]. Последний способ известен под названием электроконденсационного метода Сведберга [155, 156].

При испарении в вакууме атомарный металл конденсируется в избытке инертного газа на холодную подложку. При нагреве системы до температур выше температуры кипения инертного газа происходит необратимый быстрый рост с формированием субмикронных частиц, поэтому практического значения такая методика не имеет. Препаративные количества металлических НЧ с использованием вакуумного испарения могут быть получены при замене инертного газа на органический растворитель. В литературе это направление синтеза НЧ получило название мето-

да сольватированных атомарно-металлических дисперсий (solvated metal atom dispersions) или металлопарового синтеза [157–161].

В 1960-х гг. была разработана методика получения высокодисперсных металлов в полярных и неполярных органических средах [162]. Принцип, положенный в ее основу (метод Сведберга), заключался в применении импульсного искрового разряда высокочастотного переменного тока между частицами грубого металлического порошка в органической среде. Метод высокочастотного разряда в органических средах позволяет получать устойчивые (более 6 месяцев) золи НЧ серебра в кислородсодержащих растворителях, таких как ацетон или этилацетат [162]. Средний размер частиц в системе серебро–ацетон составляет 1,5 нм. В неполярных средах, таких как гептан, октан, бензол, толуол для стабилизации золя в состав системы вводят стабилизатор — каучук или алюминиевые соли органических кислот. Этот способ существенно проще вакуумного испарения металла, как в аппаратном оформлении, так и в методическом плане. Недостатком метода является изменение состава и частичная деструкция органической среды, происходящие при пропускании разряда, при этом продукты деструкции взаимодействуют с поверхностью НЧ [151, 163].

Следует отметить, что ни химические, ни физические методы синтеза НЧ не позволяют получать частицы без адсорбированных на поверхности веществ.

### 8.3. Методы синтеза несферических наночастиц серебра

Отдельный интерес представляет направление синтеза несферических наночастиц серебра, которые могут представлять собой как плоские фигуры — треугольники, пяти- и шестиугольники, круглые пластины, так и объемные — тетраэдры, кубы, призмы, стержни, проволоки, фигуры, образующиеся за счет кинетически контролируемых процессов роста зародышей НЧ в растворе [164–184].

Факторы, обуславливающие анизотропный рост, могут быть отнесены к двум группам: пространственно-диффузионные и сорбционные. В первом случае область роста частиц пространственно ограничена компонентами внешней среды, а во втором блокируется в определенных направлениях за счет селективной сорбции стабилизатора на некоторых кристаллографических гранях. Поэтому в большинстве случаев в данной области используется двухстадийный синтез: сначала быстро образуются «первичные» (зародышевые) частицы, которые путем медленного кинетически

контролируемого процесса трансформируются в более крупные геометрически анизотропные структуры. В случае если реакция проходит в условиях термодинамического контроля, то основным ее продуктом является термодинамически наиболее устойчивая сферическая форма частиц, обладающая минимумом поверхностной энергии.

Хорошо известно, что при старении происходят два типа превращений: структуризация крупных и исчезновение мелких частиц. В реакциях формирования НЧ серебра такой процесс начинается при температуре около 85 °С, а с ростом температуры отмечается увеличение критического размера зародыша [165]. По мере формирования кристаллической структуры НЧ серебра возможно селективное восстановление ионов  $\text{Ag}^+$  на определенных ее гранях. Для этого в состав системы вводится вещество, избирательно сорбирующееся на некоторых кристаллографических плоскостях и препятствующее их росту. В результате подобного процесса рост частицы осуществляется лишь по определенным «незаблокированным» стабилизатором направлениям. В большинстве работ в роли такого соединения выступает поли(N-винил-2-пирролидон) (ПВП), однако эффект направленного роста зафиксирован при использовании полиакриловой [166] и аскорбиновой кислот [167], цитрата натрия [168] и некоторых других реагентов. Нередко роль восстановителя и стабилизатора среды реакции выполняет одно и то же соединение. Более чем в половине литературных источников в этом качестве используется этиленгликоль. Поэтому данный тип превращений довольно часто называется полиольным методом получения.

На границе раздела фаз ПАВ могут образовывать мицеллярные среды разной геометрии, которые можно организовать таким образом, что молекулы ПАВ и воды будут формировать упорядоченную слоистую структуру. В такой среде можно провести реакцию восстановления соли серебра, приводящую к формированию анизотропных частиц [169]. До начала реакции восстановления серебра гидразином в водную фазу вводили смесь октиламина и амиламина в соотношении 25 : 1. В силу пространственных ограничений, связанных со строением водно-органической среды, получаются анизотропные плоские НЧ серебра. Описана зависимость с высокими коэффициентами корреляции между размером образующихся частиц (10–80 нм) и содержанием ионов серебра, размером и отношением концентраций вода/ПАВ [169].

Близкий подход реализован для синтеза монодисперсных кубических НЧ серебра размером  $55 \pm 5$  нм [170]. В этом случае использовали реакцию серебряного зеркала (водный раствор аммиака бромид серебра и глюкозу) при повышенных температурах в присутствии бромида ЦТМА. В результате получают упорядоченные структуры, содержащие моно-

дисперсные кубические частицы серебра в области нанометровых размеров. Увеличение соотношения ЦТМА/серебро приводит к увеличению выхода кубических нанокристаллов.

В качестве темплатов также могут использоваться жидко-кристаллические среды, в которых синтезированы кристаллические нанопроволоки с большим соотношением длины к диаметру в обратных гексагональных жидкокристаллических мицеллах с одномерными водными каналами [171].

В работе [172] предложен метод управляемого однофазного синтеза наносфер, наностержней и нанопроволок, основанный на восстановлении ионов серебра боргидридом натрия в субстратах, содержащих ДНК. По мере увеличения содержания ДНК и времени проведения реакции доля анизотропных объектов (наностержней и нанопроволок) возрастает.

Кроме «мягких» при получении анизотропных частиц могут быть использованы и «жесткие» матрицы. В [173–174] описано получение серебряных нанотрубок и наностержней путем электролиза водных растворов солей серебра в пористой матрице из оксида алюминия.

Рост папостержня начинается с декаэдрического зародыша, который образован тетраэдрическими кластерами, соединенными по своим боковым гралям. Так как двугранный угол в тетраэдре составляет приблизительно  $70,5^\circ$ , то одной из наиболее термодинамически стабильных форм таких многократно сдвоенных кластеров (multiply twinned particles, МТР) является декаэдр (пятиугольная бипирамида), состоящий из пяти тетраэдрических фрагментов, впервые описанный в [175, 176]. Подробные сведения, касающиеся экспериментального изучения структуры частиц, в том числе условий формирования и строения многократно сдвоенных кластеров, можно найти в обзоре [177].

Образование наностержней и нанопроволок происходит в случае, если процесс роста первоначально образующихся зародышей осуществляется преимущественно в одном направлении. Авторы [178] утверждают, что процесс роста наностержней может быть как термодинамически, так и кинетически контролируемым. По их сведениям, введение в состав исходной смеси аскорбиновой кислоты способствует формированию однородных (по размеру) наностержней и нанопроволок с воспроизводимым соотношением длины к ширине [165].

Описан двухстадийный синтез нанопроволок с использованием зародышей НЧ платины в качестве центров роста кристаллов серебра. На первой стадии осуществлялось восстановление хлорида платины (II) в среде этиленгликоля при  $160^\circ\text{C}$ , а затем без охлаждения в систему вводились растворы нитрата серебра и ПВП в этиленгликоле [179]. Частицы размером менее 5 нм формируются за счет гомогенной, а объекты диаметром

20–30 нм — за счет гетерогенной нуклеации на платиновых зародышах. Молекулы ПВП хемосорбируются на поверхности кристаллов серебра, препятствуя дальнейшей агрегации. Относительное содержание нанопроволок сильно зависит от температуры синтеза. Так, при температурах ниже 100 °С процесс их образования практически не идет [179].

В [165] описано получение наностержней серебра путем двухстадийного синтеза с использованием платиновых или серебряных зародышей. На первой стадии происходит восстановление солей платины или серебра под действием этиленгликоля с формированием зародышей металла. На втором этапе осуществляется введение раствора  $\text{AgNO}_3$  и ПВП. В результате формируются НЧ размером 20–30 нм. В то же время часть атомов серебра подвергается гомогенной нуклеации, которая приводит к образованию НЧ с диаметром 1–5 нм. Последние не подвержены дальнейшему росту из-за наличия в смеси достаточного количества стабилизатора.

Как отмечено выше, ПВП оказывают заметное влияние на геометрию крупных частиц за счет селективной адсорбции на разных гранях монокристалла серебра, что обуславливает анизотропию формы в процессе роста [168]. Уменьшение концентрации первичных зародышей платины вызывает сужение диаметра нанопроволок [165]. В случае использования зародышей платины или золота для роста наносеребра распределение по размерам частиц конечного продукта является бимодальным и находится в соответствии с процессом одновременной реализации механизмов гомогенной (собственной) и гетерогенной (на внешних зародышах) нуклеации.

В работе [180] исследовано термическое восстановление нитрата серебра в среде этиленгликоля в присутствии ПВП. Показано, что молекулярно-массовые характеристики ПВП оказывает определяющее влияние на процесс полиольного синтеза анизотропных частиц серебра.

Подбирая интенсивность подачи соли серебра, можно достичь таких условий, при которых скорость образования зародышей окажется равной, будет больше или меньше скорости роста анизотропных частиц. В результате удалось разработать простой и воспроизводимый способ эффективного управления синтезом нанопроволок заданной длины [77].

Вопросы медленного роста серебряных монокристаллических частиц кубической формы в ходе полиольного синтеза рассмотрены в работе [168]. Для синтеза нанокубов необходимо, чтобы исходная концентрация соли серебра была относительно высокой 0,125–0,25 М. Размер кубических НЧ в области 80–175 нм можно варьировать за счет изменения исходной концентрации прекурсора металла. Авторами [181] синтезирован ряд образцов серебряных нанопластинок толщиной около 30 нм и средним размером от 25 до 1000 нм.

В литературе описан способ получения серебряных НЧ контролируемой морфологии [182]. При концентрации цитрата натрия выше 0,1 М основным продуктом реакции являются нанопризмы. В области более низких концентраций формируются треугольные и шестиугольные структуры с широким распределением по размерам. Описан синтез и исследование серебряных нанодисков, полученных с хорошим выходом в ходе жидкофазных превращений [183]. Показано, что нанодиски имеют полосу поглощения при 475 нм и синтезируются в две стадии: формирование треугольных нанопластин (нанопризм) путем роста частиц серебра на зародышах в присутствии ЦТМА и старение треугольных нанопластин при 40 °С в течение 4 часов. Повышение выхода нанопризм может быть достигнуто за счет фотоиндуцированных реакций [184], которые проводятся как обычное восстановление нитрата серебра боргидридом натрия в присутствии стабилизатора (цитрат натрия, бис-(*p*-сульфонатофенил)фенилфосфин дигидрат дикалиевая соль).

После смешения реагентов смесь подвергают воздействию конверсионного (от лампы мощностью 40 Вт) флуоресцентного света. Реакция инициируется квантами видимого света с длиной волны 350–700 нм. Электронные микрофотографии показывают, что начальные сферические частицы размером  $8.0 \pm 1.7$  нм в конечном счете превращаются в нанопризмы. Также описан метод получения нанополосок путем восстановления водных растворов нитрата серебра аскорбиновой кислотой в присутствии полиакрилата натрия (Na-ПАК) при 4 °С [166]. Продукт реакции представлял собой нанополоски, состоящие из послойно наращенных друг на друга нанопластинок диаметром от 60 до 100 нм и высотой 30–40 нм.

#### 8.4. Антибактериальная активность наночастиц серебра

Влияние НЧ серебра на жизнедеятельность грам-отрицательных микроорганизмов *E. coli*, *V. cholera*, *P. aeruginosa* и *S. typhus* в логарифмической фазе роста была изучена в [185]. Использовались растворы различных концентраций (0, 25, 50, 75, 100 мг/л) НЧ серебра с широким распределением по размерам (от 3 до 25 нм). При этом *V. cholera*, *P. aeruginosa* отличались большей устойчивостью, чем *E. coli* и *S. typhus*, однако при содержании серебра 75 мкг/мл прекращение роста отмечалось во всех образцах. С помощью электронной микроскопии было установлено, что НЧ серебра закреплены не только на клеточной мембране, но способны также проникать сквозь нее и распределяться внутри бактерии. Такой способностью обладали только индивидуальные НЧ, но не их агломераты. Кроме того, размеры НЧ, связанных с мембраной, соответствовали размерам



частиц, находящихся внутри клетки. Это позволяет утверждать, что только кластеры, способные к взаимодействию с клеточной оболочкой, могут внедряться в цитоплазматическое пространство.

Диаметр НЧ, находящихся внутри бактерий и на их мембранах, находился в пределах  $\sim 5 \pm 2$  нм. Таким образом становится очевидным то обстоятельство, что бактерицидный эффект НЧ находится в сильной зависимости от их размера и возрастает с его уменьшением. Только НЧ с диаметром меньше 10 нм способны к непосредственному взаимодействию с бактерией. В предположение, что все частицы сферические, была рассчитана доля биологически активных кластеров в используемом образце, которая составила 0,093%. Рост микроорганизмов в значительной степени подавлялся, когда в среднем на одну клетку приходилось  $\sim 2000$  таких кластеров. Уменьшение размера НЧ сказывается на увеличении их удельной поверхности и, как следствие, реакционной способности. Этими обстоятельствами, возможно, обусловлена высокая биологическая активность частиц с диаметром, меньшим 10 нм. Механизм, по которому НЧ проникает внутрь бактериальной клетки, и проникает ли, пока клетка жива, до конца не ясен.

В работе [186] отмечены сильные изменения в мембранной структуре бактерии *E. coli*, увеличение ее проницаемости и гибели микроорганизма при взаимодействии с НЧ серебра. Наблюдение за НЧ, связанными с мембраной, и находящимися внутри клетки, является важным моментом для понимания бактерицидного действия наносеребра, т.к. находясь внутри бактерии, НЧ способны взаимодействовать с ДНК, которая утрачивает способность к репликации [187], что также вызывает ее гибель. Очевидно, что НЧ серебра выступают как самостоятельные биоцидные агенты; тем не менее для оценки вклада ионов серебра в активность НЧ в работе [185] была определена концентрация  $\text{Ag}^+$ , находящаяся в диапазоне единиц мкмольей. Это свидетельствует о некотором вкладе ионов  $\text{Ag}^+$  в бактерицидные свойства НЧ, связанном с их незначительным растворением. Однако подавление роста бактерий под действием нитрата серебра показало различие в механизмах действия ионов и НЧ на клетки.

Авторами работы [188] предложен ответ на вопрос, касающийся того, какими именно поверхностными физико-химическими свойствами НЧ серебра обусловлено их сильное антибактериальное действие. Ранее было показано, что наносеребро чувствительно к кислороду воздуха [35, 137]. В результате этого процесса образуются поверхностно-окисленные частицы, содержащие хемосорбированные ионы  $\text{Ag}^+$ . В экспериментах [188] со штаммами *E. coli* (116S, J53) проводилось изучение влияния состояния поверхности НЧ серебра на их бактерицидную активность. Для этого в инертной атмосфере восстановлением  $\text{NaBH}_4$  были синтезированы НЧ сереб-

ра  $9 \pm 3$  нм. Частично окисленный материал с адсорбированными ионами  $\text{Ag}^+$  получался при пропускании (30 мин)  $\text{O}_2$  через дисперсию НЧ. Масс-спектрометрическим методом было найдено, что равновесное содержание свободных ионов серебра в растворе НЧ не превышает 0,1% от общего количества металла что практически не вносит вклад в биоцидную активность. Оказалось, что минимальная концентрация окисленных НЧ, полностью ингибирующая рост микроорганизмов *E. coli* (116S, J53) (в логарифмической фазе), составляет всего 2 нМ, что соответствует 5,4 мкг/мл по металлу. НЧ серебра, полученные восстановлением в инертной атмосфере, антибактериальной активностью не обладали, теряли ее также и окисленные наночастицы после обработки боргидридом натрия. По спектральным данным было оценено содержание адсорбированных ионов  $\text{Ag}^+$ , оказавшееся  $\sim 12\%$  от общего количества серебра [35]. Поэтому, по мнению авторов, решающий вклад в антибактериальную активность НЧ серебра вносит не нуль-валентный металл, а ионы  $\text{Ag}^+$ , адсорбированные на их поверхности.

Для выяснения влияния размеров окисленных НЧ на их бактерицидное действие, были синтезированы крупные серебряные кластеры  $60 \pm 20$  нм. Выяснилось, что при одинаковом содержании металла растворы НЧ со средним диаметром 9,8 нм проявляли биологическую активность, в 10 раз превышающую активность крупных серебряных кластеров. Результаты исследований, посвященных изучению бактерицидной активности крупных НЧ серебра (от 25 нм и больше), представлены в работе [68].

При изучении влияния НЧ на штаммы бактерий, устойчивых к действию нитрата серебра (штаммы 116  $\text{AgNO}_3\text{R}$  и J53(pMG101)), выяснилось, что эти микроорганизмы сохраняют способность к размножению при максимально возможных в условиях эксперимента концентрациях кластеров, что также косвенно свидетельствует о том, что хемосорбированные ионы имеют решающее влияние на биоцидные свойства частиц. Подробнее о резистентных к серебру бактериях можно прочитать в работах [189, 15, 16, 190, 191].

Открытия последнего десятилетия продемонстрировали, что электромагнитные, оптические, каталитические и др. свойства наноразмерных объектов сильно зависят от их геометрической формы [192]. Исследовалось воздействие растворов нитрата серебра, сферических НЧ, наностержней и усеченных нанотреугольников с одинаковой концентрацией (1, 6, 12, 12,5, 50 и 100 мкг на 100 мл питательной среды) по металлу на клеточную культуру *E. coli* ATCC 10536. Оказалось, что для усеченных нанотреугольников практически полное ингибирование роста микроорганизмов достигалось при общем содержании серебра 1 мкг, для сферических НЧ количество 12,5 мкг существенно подавляло размножение, а при 50–100 мкг полностью его останавливало. В случае наностержней даже при

содержании серебра 100 мкг был отмечен продолжающийся рост отдельных колоний. Биоцидная активность нитрата серебра оказалась сравнимой с действием сферических НЧ [193].

Выяснение количественных оценок влияния различных поверхностей на бактерицидную емкость и активность НЧ, а также механизмов поражения бактериальных клеток в настоящее время считается приоритетным направлением исследований в этой области. Изучение фундаментальных вопросов, касающихся механизмов антибактериального действия НЧ серебра, в настоящее время находится на начальном этапе своего развития. Тем не менее, в литературе появляется все больше и больше публикаций, так или иначе использующих бактерицидные свойства серебряных наночастиц в решении прикладных медицинских и промышленных задач.

В литературе описан положительный синергический эффект наносеребра и различных антибиотиков в борьбе с *S. aureus* и *E. coli* [194]. Простая и дешевая процедура создания биосовместимого полиэлектролитного слоя на основе аминированной пленки полиэтилентерефталата, содержащего серебряные кластеры и обладающего высокой антикоагуляционной и бактерицидной активностью, описана в работе [195]. По мнению авторов, такие пленки могут иметь потенциальные применения в поверхностном модифицировании различных медицинских устройств, особенно сердечно-сосудистых имплантантов. В другой работе предложено получение и описаны свойства пищевых упаковочных материалов на основе природных полимеров, способных к биодegradации и обладающих антибактериальными свойствами за счет серебросодержащего нанокompозита [196].

Большое число работ посвящено пропитке текстильных изделий растворами НЧ серебра с целью придания им антибактериальных свойств [197–199]. Ли и др. разработали [200] простой и эффективный промышленный метод пропитки тканых и нетканых волокон НЧ серебра ~2–3 нм. Было показано, что при пропитке волокна 20 мкг/мл раствором НЧ, его полная бактериостатическая активность по отношению к грам-положительным *S. aureus* ATCC 6538 и грам-отрицательным *E. coli* ATCC 25922 не исчезала на протяжении более чем десяти влажных обработок с применением моющих средств. Кроме того, испытания материала на животных обнаружили его полную безопасность для кожных покровов.

Таким образом НЧ серебра обладают ярко выраженной антибактериальной активностью [201–206]. В настоящее время антибактериальные свойства НЧ серебра достаточно широко используются в медицине и сельском хозяйстве [207–223].

## 8.5. Биологическая активность серебра в отношении высших растений

Обширную сеть метаболических процессов, в которые вовлекаются наночастицы серебра после попадания в растения, можно условно разделить на несколько этапов, которые будут далее рассмотрены по-отдельности: а) перенос наночастиц серебра из окружающей среды в организм растений, б) химические превращения наночастиц и соединений серебра в тканях растений, в) влияние соединений серебра на физиологические процессы в растениях.

### Перенос наночастиц серебра из окружающей среды в организм растений

В ткани растений наночастицы серебра могут попадать двумя основными путями: через корневую систему из почвы и через листья [224, 225]. Первый из этих путей реализуется, например, при выращивании растений на почве, подвергшейся антропогенному загрязнению серебросодержащими соединениями или материалами, второй превалирует при обработке сельскохозяйственных растений препаратами коллоидного серебра методом опрыскивания — листовой обработки.

Эффективность проникновения коллоидного серебра в растения через корневую систему во многом определяется агрегативной устойчивостью наночастиц металла в почвенной среде. Коагуляционная устойчивость, в свою очередь, определяется как компонентным составом грунта — содержанием минеральных и органических компонентов, влажностью, содержанием электролитов, рН, так и свойствами самих наночастиц серебра — составом и структурой стабилизирующего слоя, размером и зарядом частиц. Более детальная информация о поведении коллоидного серебра в почве приведена в работах [226–230].

Анализируя эти работы, можно заключить, что наночастицы серебра при попадании в почву подвергаются быстрой гетерокоагуляции с минеральными частицами — оксидами и силикатами металлов. Скорость гетерокоагуляции зависит от состава почвы и коррелирует с содержанием глинистых частиц в широком диапазоне — от 1 до 50 масс.% глины и более. Отрицательно заряженные наночастицы серебра коагулируют быстрее вследствие гетероагрегации с положительно заряженными частицами алюмосиликатов, в частности монтмориллонита [230]. Тем не менее, даже в почвах с минимальным содержанием глинистых частиц гетерокоагуляция коллоидного серебра протекает быстро, в течение не более чем 1 часа, и приводит к иммобилизации серебра в верхнем слое почвы — в пределах слоя толщиной до 12 см [230].

Следующей стадией метаболизма серебра в почвах является химическое взаимодействие с органической частью почвы, гуминовыми и фульвокислотами, за счет реакции металлического серебра с тиольными SH-группами [231] с образованием малотоксичных органотиолятов серебра.

Таким образом, коллоидное серебро достаточно быстро связывается с компонентами почвы и иммобилизуется в ней, при этом биодоступность серебра для растений резко снижается. Наночастицы серебра способны проникать в ткани растений и накапливаться в них [232–234], чем меньше размер частиц серебра, тем эффективнее их транспорт внутри растения.

О механизмах проникновения наночастиц и ионов серебра из окружающей среды непосредственно внутрь растений известно пока немного, тем не менее было показано, что корни растений способны поглощать из окружающей среды как ионы серебра — продукты окислительного растворения наночастиц серебра [233] — так и непосредственно сами металлические частицы [235]. Наночастицы серебра поглощаются корнями существенно хуже, чем ионы серебра, даже в случае небольших по размеру наночастиц диаметром 6 нм [233], поэтому предварительное растворение наночастиц в почве является одним из ключевых условий попадания серебра в ткани растений.

В то же время дальнейшее проникновение частиц серебра из межклеточного пространства внутрь клетки затруднено, подавляющее большинство попавших на клетку частиц находится на внешней стороне клеточной стенки [236]. Следует отметить, что такое расположение частиц приводит к тому, что локальная концентрация ионов серебра вблизи мембраны и, соответственно, локализованных на ней рецепторов, регуляторных и транспортных белков, может существенно превышать внутриклеточную.

При гидропонном выращивании табака *Nicotiana tabacum* содержание серебра в корнях и листьях коррелировало с концентрацией наночастиц серебра в культуральной среде, при этом концентрация серебра в корнях — 1,7 мг/г — существенно превышала его концентрацию в листьях — 0,04 мг/г — при содержании наночастиц серебра, стабилизированных цитрат-ионом, в культуральной среде 100 мкМ в пересчете на серебро [235]. В контрольных растениях содержание серебра в тканях не превышало 0,0001 мг/г.

С другой стороны, было показано, что и при фолитарной обработке (опрыскивании растений) повышенная концентрация серебра обнаруживается как в листьях, так и в корнях, причем наибольшее накопление серебра отмечается в листьях — 123,7 мг/кг — против 1,51 мг/кг в корнях [237]. В тканях контрольных растений содержание серебра составляло 1,05 и 0,42 мг/кг соответственно.

Анализируя представленные работы, можно заключить, что достаточно эффективный транспорт наночастиц в растения возможен как через корни, так и через листья, а в дальнейшем серебро способно мигрировать по проводящим тканям как из корней в листья по ксилеме, так и из листьев в корни по флоэме. Тем не менее, судя по неравномерному распределению серебра в тканях, так переносится лишь небольшая часть серебра – менее 5% в любом из направлений. Таким образом, практически все серебро, поступившее в растения, остается в тканях, непосредственно контактировавших с наночастицами серебра. Это, помимо всего прочего, позволяет минимизировать риск попадания серебра в съедобные части растений при использовании коллоидного серебра в сельском хозяйстве.

### Метаболизм наночастиц серебра в тканях растений

В аэробных биологических средах комплексные соединения и соли серебра в степени окисления +1 являются наиболее термодинамически устойчивыми формами существования этого элемента, поэтому после попадания в растения наночастицы серебра постепенно окисляются под действием кислорода воздуха и биогенных окислителей.

В процессе дыхания и фотосинтеза в тканях растений постоянно образуются кислородсодержащие соединения и свободные радикалы, способные быстро и эффективно окислять металлическое серебро до ионов  $\text{Ag}^+$  [30, 31, 238]. К ним относятся пероксид водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$ , гидроксильный радикал  $\text{OH}\cdot$ , супероксид-радикал  $\text{O}_2^-$  и другие так называемые активные формы кислорода (АФК). Так, например в клетках растений концентрация растворенного в цитоплазме кислорода составляет  $10^{-7}$ – $2,5 \times 10^{-4}$  М, стационарная концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  –  $10^{-8}$  М и более,  $\text{O}_2^-$  –  $10^{-11}$  М,  $\text{OH}\cdot$  – менее  $10^{-11}$  М [238].

Скорость окислительного растворения наночастиц серебра пероксидом водорода почти на 2 порядка превышает скорость окисления НЧ кислотом [239, 240], поэтому в тканях растений оба этих окислителя, по видимому, играют значимую роль в образовании ионов  $\text{Ag}^+$  из НЧ серебра. Реакция НЧ Ag как с растворенным кислородом, так и с пероксидом водорода имеет первый порядок по концентрации НЧ и окислителя [239, 240].

Было показано, что окислению наночастиц серебра препятствует наличие анионов, например хлорид- [240], фосфат- и сульфид-ионов, образующих с ионами  $\text{Ag}^+$  малорастворимые соли, а также способных адсорбироваться на НЧ и блокировать диффузию окислителя к поверхности. Напротив, присутствие комплексообразующих соединений с тиольными [241] и аминокруппами [240], способных связывать ионы серебра в водо-

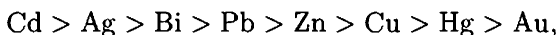
растворимые координационные соединения, ускоряет растворение. Ввиду наличия в биологических жидкостях большого количества таких эффективных комплексообразователей, становится легкообъяснимым тот факт, что уже по истечении нескольких суток после обработки растений растворами коллоидного серебра в тканях фиксируется наличие только лишь окисленного серебра [233], но не наночастиц. Таким образом, спустя короткое время после попадания в организм, в метаболизм растений оказываются вовлеченными только ионы  $Ag^+$  и образованные ими координационные соединения.

Растения в процессе роста и развития постоянно сталкиваются с необходимостью вовлекать в метаболизм биогенные металлы и в то же время осуществлять обезвреживание фитотоксичных ионов металлов, попадающих в организм из почвы и воды [242]. В ходе эволюции высшие растения приобрели специальные молекулярные механизмы, отвечающие за детоксикацию. К наиболее значимым из них относятся металлсвязывающие белки — металлотионеины — и пептиды — фитохелатины [242, 243]. Именно они формируют защитный барьер, препятствующий свободному перемещению ионов серебра по тканям растений и в значительной степени ослабляющий влияние серебра на физиологические процессы в организме растений. Металлотионеины представляют собой низкомолекулярные белки с молекулярной массой 6–10 кДа с высоким — до 33% — содержанием цистеина и обладающие по этой причине высокой аффинностью к ионам тяжелых металлов: ртути, кадмия, свинца, серебра [244]. Фитохелатины — более короткие полипептиды с общей структурой  $[\gamma\text{-Glu-Cys}]_n\text{-AA}$ , где  $n = 2 - 11$ , а AA — остаток аминокислоты, варьирующийся у различных видов растений [243].

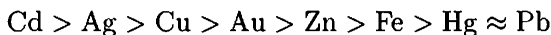
Фитохелатины образуют с ионами серебра достаточно устойчивые комплексы, которые затем связываются с мембранным переносчиком — белком НМТ 1, локализованным в тонопласте — мембране, окружающей вакуоль растительной клетки. Белок НМТ 1 осуществляет АТФ-зависимый транспорт комплексов ионов металлов с фитохелатинами через тонопласт в вакуоль, где эти комплексы и накапливаются [245, 246]. Инкапсуляция ионов серебра, связанных с фитохелатинами, в вакуоли является, по видимому, конечной стадией метаболизма серебросодержащих наноматериалов в организме растений.

В норме в растительной клетке содержится небольшое количество фитохелатинов, менее 0,05 мкмоль/г сухой массы [247]. После обработки суспензии клеток *Rawolfia serpentina* фитотоксичным  $Cd(NO_3)_2$  в течение первых 5–6 ч содержание фитохелатинов возрастает в десятки раз — до 2–5 мкмоль/г, а концентрация глутатиона, из которого с помощью фермента фитохелатинсинтазы образуются фитохелатины, соответственно падает более чем в два раза, с 7 мкмоль/г сухой массы до 2,5–3 мкмоль/г

[247]. Аналогично клетки *Rauwolfia serpentina* откликаются и на обработку  $\text{AgNO}_3$  [247]. По способности индуцировать образование фитохелатиновых ионов серебра превосходят многие фитотоксиканты. Так, например, в ряду активности ионов по способности стимулировать экспрессию фитохелатинов в клетках *Silene cucubans* [248]



и *Lycopersicon esculentum* [249]



соли серебра превосходят соли ртути и свинца.

Следует особо подчеркнуть, что прямые доказательства образования *in vivo* комплексов серебра с фитохелатинами и металлотионеинами с последующим переносом через тонопласт и накоплением в вакуоли пока отсутствуют, поскольку этот процесс комплексно изучался в основном на примере ионов  $\text{Cd}^{2+}$  [243, 247], которые более чем на 90% перехватываются цистеин-содержащими полипептидами и транспортируются в вакуоли [243]. Тем не менее совокупность косвенных данных, включая сведения о распределении серебра в тканях растений, о переносе серебра в пределах растения, а также о стимулировании продуцирования фитохелатинов при контакте растений с ионами серебра свидетельствует в пользу гипотезы о том, что механизм детоксикации фитотоксичных ионов металлов в полной мере задействуется и при проникновении в ткани растений ионов серебра.

Несмотря на то, что известны случаи биогенного восстановления небольшой доли ионов серебра до металла в клетках, например, люцерны *Medicago sativa* [250, 251] и горчицы *Brassica juncea* [251, 252], переход ионов  $\text{Ag}^+$  в  $\text{Ag}^0$  в растительных тканях у подавляющего большинства других растений практически не происходит, поэтому влияние серебра на растения обусловлено только процессами с участием ионов  $\text{Ag}^+$ . И люцерна, и горчица являются растениями-металлофитами [251], способными расти в присутствии больших количеств ионов тяжелых металлов, поэтому отмеченная способность восстанавливать часть ионов серебра до наночастиц является, по-видимому, специфической особенностью метаболизма этих видов растений, возможно связанной с эволюционной адаптацией к обитанию на загрязненных тяжелыми металлами территориях.

### Пути влияния серебра на физиологические процессы в растениях

Как уже было отмечено, после попадания в растения наночастицы серебра достаточно быстро растворяются с образованием ионов  $\text{Ag}^+$ , которые и определяют их биологическое действие.



Катионы серебра  $\text{Ag}^+$ , как и ионы других металлов, способны вступать в реакции комплексообразования с широким кругом электронодонорных лигандов, включающим многочисленные кислород-, азот-, и серосодержащие соединения, в частности карбоновые кислоты, амины, аминокислоты и тиолы. Особенно прочные комплексы ионы серебра образуют с соединениями серы и, в меньшей степени, азота. По устойчивости комплексов с этими лигандами серебро занимает уникальное промежуточное положение между биогенными элементами — медью, железом, кобальтом — с одной стороны и такими фитотоксикантами, как ртуть, свинец, кадмий. Как следствие, ионы серебра потенциально способны связываться со многими органическими соединениями, составляющими растительную клетку, а также вытеснять другие металлы —  $\text{Cu}$ ,  $\text{Fe}$ ,  $\text{Co}$ ,  $\text{Mn}$ ,  $\text{Zn}$  — из менее устойчивых комплексных соединений. Способность к такому связыванию с компонентами клеток обуславливает высокую биологическую активность соединений серебра в отношении не только растений, но и других живых организмов, что необходимо учитывать при применении серебросодержащих препаратов.

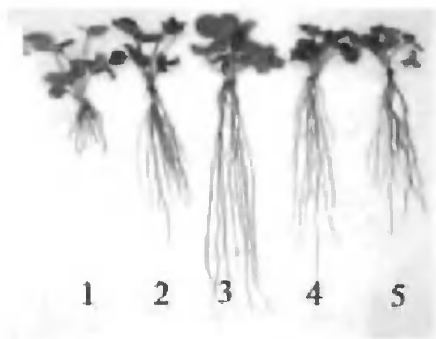
Так, например, с древнейших времен используется антибактериальное и фунгицидное действие серебра [253]. Именно антимикробной активности этот металл обязан своей многовековой историей применения в быту и медицине. Действительно, ионы серебра в концентрации 1 мг/л (около 10 мкМ) и менее подавляют рост прокариот, одноклеточных водорослей и зоопланктона, в концентрации 1–10 мг/л — клеток дрожжей, 10–20 мг/л — мицелиальных грибов [253]. В то же время, токсическое действие серебра на многоклеточные организмы гораздо менее выражено — ингибирующая концентрация  $\text{IC}_{50}$  нитрата серебра для высших растений составляет 10–150 мг/л и более [254], летальная доза  $\text{LD}_{50}$  для грызунов при различных способах введения — 50–400 мг/кг.

По упомянутым причинам действие высоких — фитотоксичных — концентраций серебра на растения в целом схоже с действием ионов других тяжелых металлов — свинца, ртути, кадмия, более того, как уже отмечалось, для защиты от этих токсикантов активизируются одни и те же механизмы [242, 244, 247–249]. Несмотря на это, с учетом различий в токсичности серебра для разных групп организмов становится очевидной возможность использования солей серебра в низких концентрациях для подавления, например, фитопатогенной микрофлоры, при этом дозу препарата можно подобрать таким образом, чтобы не повредить обрабатываемые растения.

Следует отметить, что бактерицидные и фунгицидные дозы серебра лишь в 10–100 раз меньше фитотоксичных, поэтому при использовании препаратов серебра даже в таких дозах можно было бы ожидать более или менее выраженного угнетения роста и развития растений [255, 256].

Тем не менее, оказалось, что обработка растений соединениями серебра в низких и средних концентрациях зачастую сопровождается обратными эффектами — ускорением роста корней и стеблей, активным накоплением биомассы, фотосинтетических пигментов, а также замедлением процессов старения в растительном организме [24, 257, 258]. На рис. 8.3 приведен пример такой немонотонной зависимости доза-эффект при обработке ростков земляники *Fragaria ananassa* нитратом серебра.

Резкое изменение интенсивности и, главное, направленности действия серебра уже при небольшом изменении его концентрации существенно затрудняет разработку эффективных средств защиты растений на основе растворимых солей серебра и схем их применения [259]. Кроме того, фитотоксичность больших доз серебра позволяет вносить препараты серебра только поэтапно — так, чтобы текущая концентрация серебра постоянно находилась вблизи оптимального значения. В совокупности эти факторы на протяжении многих десятилетий создавали практически непреодолимый барьер на пути создания препаратов серебра, предназначенных для обработки растений, выращиваемых в открытом или закрытом грунте.



**Рис. 8.3.** Влияние обработки нитратом серебра на развитие корневой системы земляники садовой *Fragaria ananassa* Duch. «Тююпока» при выращивании на агаризованной среде с различными концентрациями нитрата серебра ( $c(\text{AgNO}_3)$ ) [24]. Цифрами на рисунке обозначены концентрации  $c(\text{AgNO}_3)$ , 1–4,0 мг/л, 2–2,0 мг/л, 3–1,0 мг/л, 4–0,5 мг/л, 5–0,0 мг/л (контроль)

Учитывая то, что растительные белки содержат и азот, и серу, и то, что ионы металлов входят в состав коферментов, а также то, что ферментативная активность белков чрезвычайно сильно зависит от даже небольших изменений структуры молекулы, становится понятной чувствительность растительного организма даже к сравнительно небольшим количествам серебра. Кроме того, химия координационных соединений серебра (I) схожа с химией меди (I), в связи с этим ионы серебра способны встраиваться в метаболические цепочки в организме растений, заменяя в них ионы  $\text{Cu}^+$ , играющие важную роль в физиологии высших растений [260–262].

Каталитически активные белки за период эволюции достигли такого совершенства, что произвольное изменение их структуры практически гарантированно приводит к снижению или даже к полному прекращению

работы этих молекулярных машин, поэтому при действии больших доз серебра, нормальное функционирование ферментных систем нарушается вплоть до гибели клетки. Безусловно, изменение активности ферментов при связывании с серебром определяется концентрацией ионов  $\text{Ag}^+$  и неодинаково выражено для различных белков. В этом и состоит ключ к пониманию многообразия форм проявления и видовой специфичности биологического действия серебра на высшие растения.

Так, при увеличении концентрации серебра вначале затрагиваются наиболее чувствительные белки и физиологические процессы, затем менее чувствительные. При этом, несмотря на наблюдаемое общее подавление ферментативной активности, баланс различных путей метаболизма растительного организма сдвигается, что может привести к значительной активации одних процессов на фоне других. Именно поэтому добиться гарантированного проявления позитивного биологического действия ионов серебра было возможно только лишь в условиях гидропонного выращивания или в аналогичных строго контролируемых условиях. Так, например, тиосульфатный комплекс серебра  $[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{3-}$  в концентрации 0,2 мМ (около 20 мг/л в пересчете на содержание серебра) было предложено добавлять в воду для предотвращения преждевременного увядания срезанных цветов [263]. Тиосульфатный комплекс серебра в такой концентрации не был фитотоксичен, напротив — существенно продлевал свежесть срезанных цветов.

Преодолеть затруднения, связанные с точностью дозировки и негативным действием больших доз серебра, оказалось возможным только с появлением принципиально нового класса серебросодержащих препаратов — коллоидных растворов, содержащих частицы металлического серебра [26, 27]. Как уже было рассмотрено, в организме растений такие частицы ведут себя, как своеобразный контейнер — постепенно, под действием кислорода воздуха или в результате окисления эндогенными активными формами кислорода, в частности пероксидом водорода, серебро окисляется, и в раствор поступают ионы серебра. Замедленное высвобождение ионов серебра позволяет, с одной стороны, легко поддерживать требуемую концентрацию ионов и, с другой стороны, эффективно предохранять растения от высоких фитотоксичных концентраций серебра.

Экспериментальные наблюдения свидетельствуют о том, что влияние на растения низких — ниже летальных — концентраций серебра так или иначе затрагивает множество биохимических процессов в растительной клетке [1–4], но в наибольшей степени — две большие группы метаболических процессов, проявляющих повышенную чувствительность к воздействию серебра: а) систему этилен-зависимой регуляции роста и развития растений и б) систему активации окислительного стресса, как универсаль-

ной системы отклика растений на действие неблагоприятных факторов окружающей среды.

### **Влияние серебра на этилен-зависимую регуляцию роста и развития растений**

В середине 70-х годов прошлого века было надежно установлено [257, 258], что в растительном организме к наиболее подверженным действию серебра относятся физиологические процессы, регулируемые фитогормоном этиленом. Зачастую наблюдаемое биологическое действие ионов серебра в низких и средних дозах — это действие ингибитора отклика растения на этилен [261, 264–267]. Считается что именно блокированием отклика рецепторов на действие этилена обусловлено, в частности, упомянутое замедление увядания срезанных цветов, обработанных ионами серебра [263].

С другой стороны, соли серебра стимулируют рост стебля, корня и листьев, ветвление корней, раннее цветение, предотвращают опадание листьев и увядание цветков, наблюдаются и многие другие эффекты, традиционно ассоциируемые с ингибированием биосинтеза этилена или с уменьшением чувствительности растений к нему, в частности стимуляция транспорта ауксинов, усиление продуцирования биогенных полиаминов [266], что в свою очередь ускоряет пролиферацию клеток.

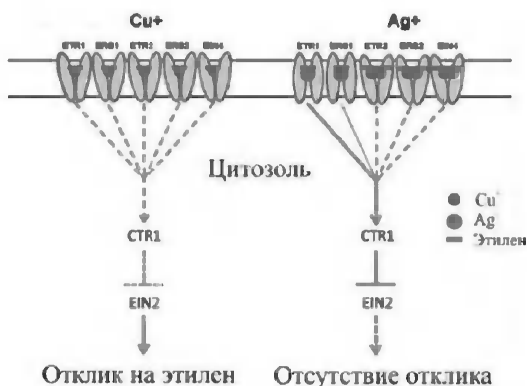
Причиной такого действия серебра является способность ионов  $\text{Ag}^+$  вытеснять сходные по электрошюй структуре ионы меди (I) из локализованного на клеточной мембране рецептора этилена ETR1 (Ethylene Receptor 1) [262]. Ионы меди и, в меньшей степени, ионы серебра способствуют связыванию этилена с клеточной мембраной. Тем не менее ингибирование клеточного ответа на воздействие этилена позволяет заключить, что ионы серебра, даже способствуя связыванию этилена, нарушают нормальное функционирование рецептора, не позволяя ему передать сигнал клетке [262, 268]. Схематическое изображение данного состояния приведено на рис. 8.4. В работе [269] на основе анализа взаимодействия ионов меди и серебра с различными рецепторами этилена и их мутантными формами было показано, что рецепторы ETR1 с ионами серебра вместо ионов меди действительно хуже связывает этилен, но основная причина блокирования клеточного ответа на этилен состоит в том, что ионы  $\text{Ag}^+$ , более крупные, чем ионы  $\text{Cu}^+$ , блокируют изменение конформации рецептора, которое необходимо для дальнейшей передачи сигнала в клетку.

### **Окислительный стресс, вызванный ионами серебра**

Ионы серебра способны вытеснять ионы меди и из других металлопротеиновых комплексов, в частности из медь-зависимых ферментов, к которым

относятся многие оксидазы, супероксиддисмутазы. Медь входит в состав регуляторных белков, принимает участие в электронном транспорте при фотосинтезе, дыхании в митохондриях, ответе на окислительный стресс и гормональной регуляции, играет важную роль в передаче сигналов транскрипции и системах перемещения белков, окислительного фосфорилирования и мобилизации железа. Серебро, заменяя медь, влияет на все эти процессы, оказывая, в итоге, многогранное влияние на организм растений.

**Рис. 8.4.** Функционирование этиленопосредованной сигнальной системы растений *Arabidopsis thaliana* в присутствии солей меди и серебра; ETR1, ERS1, ETR2, ERS2, EIN4 — различные мембранные рецепторы этилена



Обнаружено, в частности, ингибирование серебром активности полифенолоксидазы и каталазы [25]. Оксидазы ответственны за разрушение многих эндогенных и экзогенных биологически активных соединений. Серебро в небольших концентрациях способно снижать активность этих ферментов, что, в свою очередь приводит к накоплению в тканях растений ауксинов и полифенолов, в форме окисляемых соответствующими оксидазами.

Ингибирование супероксиддисмутаз приводит к накоплению в растительных тканях супероксид-радикала  $\text{O}_2^-$ , что, в свою очередь, вызывает развитие окислительного стресса — накопления эндогенных токсичных активных форм кислорода, постоянно образующихся в процессе дыхания и фотосинтеза, и разрушающихся комплексом специализированных ферментов, в число которых входят каталаза, супероксиддисмутазы и различные оксидазы. Например, в работе [24] было показано, что воздействие нитрата серебра в концентрации 4 мг/л приводит к увеличению скорости образования  $\text{O}_2^-$  в 2.5 раза и увеличению интенсивности перекисного окисления липидов более чем в 4 раза.

В норме концентрация АФК в клетке контролируется рядом независимых антиоксидантных систем, взаимно дополняющих функционирование

друг друга. Влияние ионов серебра на две из них — оксидазы и супероксиддисмутазы — уже было рассмотрено. Но ионы  $\text{Ag}^+$  существенно изменяют функционирование и третьей важной антиоксидантной системы — глутатион/глутатионредуктазной [247]. В растительных клетках, как уже упоминалось ранее, содержится достаточно большое количество свободного глутатиона — несколько мкмоль/г сухой массы [247]. Глутатион разрушает эндогенные АФК, окисляясь при этом до глутатиондисульфида, который затем с участием фермента глутатионредуктазы восстанавливается обратно в глутатион [242, 270]. При попадании ионов серебра в клетку глутатион начинает расходоваться на образование защитных полипептидов — фитохелатинов, что с неизбежностью препятствует нормальному выполнению им своей функции разрушения АФК, что в свою очередь приводит к накоплению активных форм кислорода и развитию выраженного окислительного стресса [247].

Накопление сильных окислителей в ходе развития окислительного стресса в целом негативно влияет на жизнедеятельность отдельно взятой растительной клетки. АФК вызывают повреждения белков, что проявляется в окислении тиольных групп ферментов, фрагментации пептидных цепей, повышении чувствительности белков к действию протеаз, способны взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами, вызывая повреждение азотистых оснований и углеводных фрагментов [30, 31]. Одной из основных мишеней АФК являются липиды — основные компоненты клеточных мембран. АФК способны инициировать их перекисное окисление, сопровождающееся нарушением функций мембран, например увеличением их проницаемости [24, 30, 31]. Кроме этого, продукты перекисного окисления липидов обладают мутагенной активностью и блокируют деление клеток [30, 31, 271]. Действие АФК проявляется также в снижении содержания и соотношения основных пигментов фотосинтеза, нарушениях водного обмена [30, 31].

Следует отметить, что окислительный стресс является универсальным механизмом отклика растений на неблагоприятные факторы окружающей среды. Накапливающийся в процессе индукции окислительного стресса пероксид водорода является сигнальной молекулой, регулирующей экспрессию генов и продуцирование фитогормонов [272].

Изменения в метаболизме растений под действием повышенных концентраций пероксида водорода направлены, преимущественно, на нивелирование негативного внешнего воздействия. В частности, пероксид водорода индуцирует синтез стрессовых белков, повышающих устойчивость организма растений к изменениям температурного и водного режима: гипер- и гипотермии, засухе [30, 31]. Инвазия фитопатогенов также сопровождается запуском механизма окислительного стресса, а повышенные концентра-

ции АФК индуцируют образование фитоалексинов — низкомолекулярных полициклических соединений, помимо прочего замедляющих рост патогенных микроорганизмов [30, 31, 273]. Кроме того, сами АФК негативно влияют на жизнедеятельность микроорганизмов, предотвращая развитие инфекции и способствуя локализации заражения.

Таким образом, умеренная активация окислительного стресса ионами серебра может способствовать повышению сопротивляемости растений неблагоприятным факторам внешней среды, но чрезмерная индукция окислительного стресса при действии высоких фитотоксичных концентраций серебра приводит к гибели растительных клеток.

### Влияние различных форм серебра на рост и развитие растений

Рассмотрев основные пути влияния ионов  $Ag^+$  на метаболизм высших растений, можно заключить, что на макроскопическом уровне действие серебра должно выражаться как суперпозиция: а) эффектов, связанных с блокированием этилен-зависимой сигнальной системы и заключающихся в основном в стимуляции вегетации, роста корня и побегов, накоплении биомассы и замедлении созревания и процессов увядания и б) эффектов, связанных с окислительным стрессом, заключающихся в нарушении нормальной жизнедеятельности клеток, с одной стороны, и стимулировании устойчивости к неблагоприятным внешним воздействиям, в том числе инфицированию фитопатогенами, с другой стороны. То есть действие небольших концентраций серебра должно быть стимулирующим в отношении роста, развития и устойчивости растений, а более высокие концентрации должны оказывать прямо противоположное фитотоксическое действие. Результаты экспериментальных лабораторных и полевых исследований биологического действия коллоидного серебра и солей серебра хорошо согласуются с описанными механизмами действия серебра на молекулярном уровне. Например, при обработке ростков земляники *Fragaria ananassa* питратом серебра [24, 257, 258] по мере увеличения концентрации  $AgNO_3$  от 0 до 1,0 мг/л наблюдается стимуляция роста растений (рис. 8.3), а при более высоких концентрациях — ингибирование.

Имеющиеся многочисленные результаты исследований биологического действия наночастиц серебра в отношении различных видов растений также указывают на то, что наличие серебра в почве или твердой культуральной среде в пределах 100 мг/кг [25, 26, 29, 274–276], а в отдельных случаях до 400 мг/кг [277] способствуют увеличению размеров корней и стеблей, активации процессов фотосинтеза, ускорению прорастания семян, в то время как действие более высоких доз наносеребра фитотоксично —

подавляется рост растений, уменьшается всхожесть семян [278, 279]. При гидропонном выращивании растений фитотоксичность наночастиц серебра проявляется при более низких концентрациях [280–282], что связано, по-видимому, с большей биодоступностью серебра.

Тем не менее данные различных исследований весьма сложно сравнивать между собой в связи с использованием различных, в частности по размеру и составу стабилизирующего слоя, наночастиц и существенно отличающихся протоколов исследований.

Для корректного сравнения действия НЧ серебра в последние годы нами вместе со специалистами в области защиты растений и агрохимии были проведены исследования по изучению действия НЧ серебра на различные виды растений в сравнимых условиях. Для сравнительных экспериментов применялась дисперсия НЧ серебра, стабилизированная положительно заряженным полимером из класса гуанидинов — гидрохлоридом полигексаметиленбигуанида (ПГМБ), характеризующаяся низкой токсичностью для человека и животных [25, 26, 28, 283–288]. В сочетании с коллоидным серебром ПГМБ проявляет ярко выраженный синергетический эффект стимуляции роста и развития растений, что связано, в первую очередь, с обеспечением хорошей агрегативной устойчивости дисперсии и, вместе с тем, хорошей адгезией к семенам и листьям растений, благодаря положительно заряженной поверхности химически модифицированных ПГМБ наночастиц серебра. Для испытаний использовался разработанный с участием сотрудников химического факультета МГУ препарат с торговым наименованием «Зеребра Агро», который содержал 500 мг/л коллоидного серебра и 100 мг/л ПГМБ.

Сравнительное изучение биологической активности препарата проводилось в 2013–2016 годах на озимой пшенице в Краснодарском крае и Рязанской области; на ячмене яровом в Рязанской области; на яровом рапсе в Липецкой области и Краснодарском крае; на подсолнечнике в Краснодарском крае; на сахарной свекле в Краснодарском крае и Белгородской области; на картофеле в Краснодарском крае и Московской области; на винограде в Краснодарском крае; на яблоне в Московской области [285]. Рассмотрим обобщенные по результатам испытания данные.

### **Влияние НЧ серебра на рост пшеницы**

Исследования, проведенные в Краснодарском крае на озимой пшенице сорта «Москвич», показали, что фолиарная обработка растений в фазе кущения стимулировала рост растений в высоту (77,6–84,7 см, в контроле — 73,0), нарастание биомассы и сухой массы надземными органами (18,24–20,92 г, в контроле — 16,21; 4,40–5,69 и 3,76 г соответственно). В опытных



вариантах формировались более крупные по размеру и озерненности колосья с большей, чем в контроле, массой зерна с растения. Максимальные значения рассматриваемых показателей были отмечены в варианте с применением препарата «Зеребра Агро» в дозе 100 мл/га (длина колоса — 8,8 см, в контроле — 7,1 см; озерненность — 29,7 и 21,4 шт., масса зерна с растения — 1,51 и 1,29 г соответственно). Во всех опытных вариантах получена более высокая, чем в контроле, урожайность озимой пшеницы (55,9–59,1 ц/га, в контроле — 50,7 ц/га). Максимальная прибавка (16,6%) отмечена при применении препарата «Зеребра Агро» в дозе 100 мл/га. Препарат оказал существенное влияние и на технологические показатели качества зерна. Зерно формировалось более выполненное и выровненное (натура — 764,4–778,2 г/л, в контроле — 735,6 г; масса 1000 зерен — 32,4–35,6 и 30,7 г соответственно), с более прочной, чем в контроле, консистенцией зерновки (стекловидность — 37,0–42,0, в контроле — 35,0%).

### Влияние НЧ серебра на рост ячменя ярового

В 2013 г. в Рязанской области проводились исследования на ячмене яровом сорта «Данута». Обработка семян ячменя ярового препаратом «Зеребра Агро» в дозе 60 мл/т повысила энергию прорастания семян на 6,9%, при применении препарата в дозе 80 мл/т — на 4,7%, в дозе 40 мл/т — на 2,8%, по сравнению с контролем. Количество всходов обработанных семян превысило контроль в среднем на 10,1–10,4%. Растения из семян, проросших большим числом корешков (рис. 8.5), скорее переходят к автотрофному питанию и у них впоследствии образуется больше узловых корней, что отмечено в вариантах с применением препарата в дозах 60 мл/т и 80 мл/т. Прибавка урожайности получена в вариантах с применением препарата в дозе 80 мл/т, она составила 3,2 ц/га или 10,3% в дозе 60 мл/т — 2,9 ц/га (9,3%), в то время как доза 40 мл/т не обеспечила статистически значимой прибавки урожайности ярового ячменя.

### Влияние НЧ серебра на рост рапса

Исследования, проведенные на яровом рапсе сорта «Ратник» в Липецкой области, показали, что в результате предпосевной обработки семян и посевов рапса в фазе бутонизации регулятором роста растений «Зеребра Агро», фазы зеленый стручок и полное созревание семян наступали раньше на 3 и 5 дней соответственно, чем в контрольном варианте. При этом урожайность рапса достоверно увеличивалась при применении всех изучаемых доз препарата. Наибольший урожай семян рапса 18,0 ц/га, в контроле — 14,8 ц/га получен при использовании «Зеребра Агро» в дозах 100 мл/т при предпосевной обработке семян и 100 мл/га при опрыскивании посевов

рапса в фазу бутонизации. Наиболее эффективным является использование «Зеребра Агро» для предпосевной обработки семян в дозе 50 мл/т в сочетании с опрыскиванием посевов рапса в фазу бутонизации в дозе 50 мл/га.



Рис. 8.5. Обработка препаратом «Зеребра Агро» в фазе кущения ячменя ярового (по 8 растений), слева направо цифрами обозначено 1) контроль без обработки, обработка в дозе: 2) 40 мл/т, 3) 60 мл/т, 4) 80 мл/т

Густота стояния растений рапса перед уборкой урожая при использовании возрастающих доз «Зеребра Агро» увеличивалась и достигла наибольшего значения при применении препарата в дозе 100 мл/т — для предпосевной обработки семян и 100 мл/га — для опрыскивания посевов, она составила 90 шт./м<sup>2</sup>, в контроле 67 шт./м<sup>2</sup>.

Яровой рапс, возделываемый на семена, является, прежде всего, масличной культурой. Поэтому основным показателем качества его семян является масличность. Применение регулятора роста растений «Зеребра Агро» (на семенах и растениях) повысило масличность семян (38,2–38,4%, в контроле — 38,0%). Сбор масла в опытных вариантах возрос значительно — на 15,1–22,9%.

### Влияние НЧ серебра на рост подсолнечника

Так как на культуре рапса удалось достигнуть повышения масличности семян, то были проведены опыты по изучению воздействия препарата на рост и созревание другой масличной культуры — подсолнечника различных сортов.

Применение препарата «Зеребра Агро» при возделывании подсолнечника сорта «Кубанский 930» в Краснодарском крае положительно сказалось на формировании репродуктивных органов. Все дозы оказали достоверное положительное влияние на общее число семян (1385–1395 шт., в контроле — 1348 шт., НСР<sub>05</sub> — 27,1 шт.) и число выполненных семян (1167–1178 шт., в контроле — 1119, НСР<sub>05</sub> — 29,3 шт.), на массу 100 семян (66,7 г, в контроле — 65,1 г, НСР<sub>05</sub> — 1,1 г). Во всех опытных вариантах масса семян с корзинки существенно превышала таковую контрольного варианта (76,91–78,57 г, в контроле — 72,85 г, НСР<sub>05</sub> — 2,65 г). Формирование большего числа семян в корзинке, более крупных и выполненных при применении препарата «Зеребра Агро» (на семенах и растениях) способствовало получению достоверной прибавки урожая (0,13–0,22 т/га, НСР

05–0,11 т). Максимальная урожайность получена при обработке семян и опрыскивании растений подсолнечника повышенной дозой «Зеребра Агро» (100 мл/т + 100 мл/га) — 0,22 т/га (8,2%).

Исследования препарата «Зеребра Агро» на гибриде подсолнечника сорта «факел» так же проводились в Краснодарском крае. Достоверная прибавка урожая получена при обработке семян и опрыскивании растений подсолнечника препаратом «Зеребра Агро» в фазу начала бутонизации (в дозе 100 мл/т — 100 мл/га) — 0,31 т/га. Сбор масла по сравнению с контролем повысился на 130 кг/га или 10,8%. Регулятор роста «Зеребра Агро» оказал достоверное влияние на структуру урожая подсолнечника: количество выполненных семян в корзинке в одной корзинке было в среднем на 217 штук больше, масса 1000 семян возросла на 4,3 г, высота растений — на 4 см.

### Влияние НЧ серебра на рост и развитие свеклы

Исследования влияния НЧ серебра, стабилизированных ПГМБ, на рост и развитие различных сортов сахарной свеклы проводились в сопоставимых условиях в Краснодарском крае и Белгородской области. Обработка семян и растений сахарной свеклы сорта «орикс» в фазе 3–4 пар листьев препаратом «Зеребра Агро» усилила процесс листообразования (число листьев — 13,6–16,3 и 16,0–20,3 шт., в контроле — 11,7 и 15,7 шт.; площадь листьев — 15,34–18,81 и 17,48–22,26 дм<sup>2</sup>, в контроле — 12,72 и 15,88 дм<sup>2</sup>). Следует при этом отметить, что увеличение доз препарата приводило к увеличению площади листьев, максимальная она была в варианте с применением испытуемого препарата по схеме: протравка семян из расчета 100 мл/т, листовая обработка препаратом при норме расхода 100 мл/га.

Обработка семян и растений сахарной свеклы препаратом «Зеребра Агро» способствовала снижению степени проявления заболеваний: мучнистой росы 2–7%, в контроле — 10%; церкоспороза — 0–3% и 5%; фомоза — 0–4% и 7%; бактериальной пятнистости — 1–2 и 3% соответственно. Степень пораженности растений сахарной свеклы снижалась с повышением дозы препарата. Так, степень поражения мучнистой росой снизилась с сильной до слабой, в контроле — 10%, в варианте с дозой 100 мл/т на 1 га — 2%, бактериальной пятнистостью с 3% до 1%; в указанном опытном варианте поражения церкоспорозом и фомозом не было обнаружено, в то время как в контрольном варианте степень поражения этими болезнями составила 5 и 7% соответственно.

Усиление ростовых и формообразовательных процессов в растениях сахарной свеклы, а также повышение устойчивости их к болезням способствовало получению высокого урожая корнеплодов (407,7–441,4 ц/га,

в контроле — 366,6 ц/га). Максимальная прибавка урожая (20,4%) получена в варианте с обработкой семян и растений в фазе 3–4 пар листьев в дозе 100 мл/т/ на 1 га. В опытных вариантах улучшилось качество корнеплодов, сахаристость составила 19,1–19,6% (в контроле — 18,8), что привело к значительному повышению сбора сахара с гектара (на 13,0–28,7%).

В исследованиях, проведенных на сахарной свекле гибрида «каскад» в Белгородской области, урожайность корнеплодов сахарной свеклы в опытных вариантах возросла в сравнении с контролем на 3,3–8,2 т/га. Максимальная прибавка получена в варианте с обработкой семян препаратом «Зеребра Агро» в дозе 100 мл/т и опрыскивании растений в фазе 3–4 пар листьев в дозе 100 мл/га. Прибавка урожая составила 8,2 т/га при урожайности 34,4 т/га в контроле, сахаристость корнеплодов возросла на 1,7% (18,6%, в контроле — 16,9%), сбор сахара — на 36,2% за счет увеличения урожайности и сахаристости корнеплодов.

### Влияние НЧ серебра на продуктивность винограда

Обработки препаратом «Зеребра Агро» винограда сорта «дмитрий» в условиях Прикубанской зоны плодородства Краснодарского края в 2013 г. способствовали улучшению технических показателей винограда, в частности отмечена тенденция увеличения средней массы ягоды — на 0,02–0,07 г — и количества ягод на грозди — на 1,1–12,6 шт. Наибольшее увеличение средней массы грозди отмечено при повышенных нормах расхода препарата, прибавка составила при обработке препаратом в дозе 150 мл/га — 16,2 г, в дозе 200 мл/га — 12,2 г. Прибавка урожая винограда также отмечена только в вариантах с повышенными нормами расхода препарата 150 и 200 мл/га (табл. 8.1).

**Таблица 8.1.** Продуктивность винограда сорта «дмитрий» после фоллиарной обработки препаратом «Зеребра Агро»

Варианты опыта	Число гроздей на кусте, шт.	Урожайность с куста, кг/куст	Урожайность, т/га	Прибавка к контролю	
				т/га	%
Контроль — без обработки	70,8	7,24	8,05	—	—
100 мл/га	67,4	7,26	8,06	0,1	1,2
150 мл/га	69,1	8,14	9,05	1,0	12,4
200 мл/га	80,0	9,09	10,10	2,05	25,4

## Влияние НЧ серебра на продуктивность яблони

В испытаниях в Московской области на яблоне сортов «вишневое» и «лобо» специально было отмечено, что даты прохождения фенотипических фаз растений яблони сорта «вишневое» в контрольном и опытных вариантах существенно не отличались от среднесезонных. Интенсивность цветения растений яблони сортов «лобо» и «вишневое» была средняя. Обработка растений яблони сортов «лобо» и «вишневое» «Зеребра Агро» во всех случаях приводила к повышению завязываемости плодов обоих исследуемых сортов. Завязываемость плодов по сравнению с контролем выше была на растениях сорта «вишневое» (30,5–40,2%). Для сорта «лобо» этот показатель составил 10,7–19,5%.

Применение препарата на основе НЧ серебра способствовало проявлению отчетливой тенденции роста продуктивности растений. Наибольшая масса яблок для сорта «лобо» с одного растения (21,3 кг/растение) и количество яблок на одном растении (190 шт./растение) получены в варианте с расходом препарата 150 мл/га. Максимальная продуктивность растений яблони была отмечена в варианте с обработкой растений препаратом в дозе 200 мл/га. Биохимический анализ плодов яблони показал, что листовая обработка растений сортов «вишневое» и «лобо» регулятором роста «Зеребра Агро» при расходе препарата 150 мл/га и 250 мл/га положительно повлияла на увеличение содержания витамина С в яблоках. Содержание сахаров в яблоках указанных сортов при обработке препаратом также возрастает, но на сорте «лобо» при расходе регулятора роста 150 мл/га содержание сахаров по отношению к контролю снижается.

Так как серебро традиционно считается антибактериальным агентом, была проведена оценка воздействия исследуемого препарата на поражение яблони паршой (*Venturia inaequalis*) и бурой пятнистостью (*Phyllosticta mali*). Было установлено, что пораженность плодов и листьев паршой и листьев — бурой пятнистостью в вариантах с обработками препаратом отличались от контрольного варианта. В целом наиболее эффективной для защиты растений от инфекционных болезней можно считать обработку растений яблони с расходом препарата 200 мл/га. Пораженность паршой яблок сорта «вишневое» 0,97–1,10 балла, распространенность 53,1–61,0%, развитие 24,0–27,5%.

Исходя из проделанных экспериментов, можно констатировать, что применение препаратов НЧ серебра в сельском хозяйстве имеет большой потенциал. Препараты воздействуют на растения как на этапе предпосевной обработки, так и на последующих этапах. Учитывая низкую токсичность дисперсий НЧ серебра и ярко выраженные биологические эффекты повышения урожайности сельскохозяйственных культур можно предполо-

жить, что в ближайшее десятилетие данное направление будет стремительно развиваться.

## Заключение

В результате обобщения представленного материала можно утверждать, что общие принципы препаративных методов получения НЧ в настоящее время достаточно хорошо разработаны, однако и по сей день остаются актуальными проблемы синтеза водорастворимых НЧ серебра, агрегативно устойчивых в широких интервалах рН, температур и ионной силы. Высокая антибактериальная активность НЧ серебра в сочетании со сложностью выработки микроорганизмами резистентности к соединениям серебра способствует широкому использованию наносеребра для создания бактерицидных покрытий и лекарств.

Вместе с тем, свойство гидрофильности оказывается особенно ценным для практического применения НЧ в области аналитической химии, биологии и медицины, так как почти все их объекты предполагают наличие водной среды. Отдельной и трудно решаемой задачей в настоящее время является разработка универсальных и высокоэффективных методов очистки материалов на основе НЧ серебра. Это необходимо для их дальнейшего использования в микроэлектронике, медицине, спектроскопии, катализе и других областях.

Препараты на основе серебра (включая НЧ серебра) проявляют высокую биологическую активность в отношении высших растений. Ростостимулирующее действие наблюдается при концентрациях порядка 1–10 мг/л в пересчете на металл, которое сменяется на угнетающее при фитотоксичной концентрации ионов серебра свыше 100–400 мг/кг. Влияние серебра на организм растений связано, прежде всего, с действием ионов серебра, постепенно высвобождающихся в процессе окислительного растворения наночастиц. Наиболее выраженным каналом влияния ионов серебра на организм растений является угнетение отклика клеток на фитогормон этилен, что приводит к соответствующим изменениям баланса физиологических процессов.

Фитотоксичность серебра и ярко выраженная зависимость величины и направленности его биологического действия от дозы до недавнего времени препятствовали широкому использованию серебряносодержащих препаратов в качестве регуляторов роста и развития растений. По нашему мнению, этот недостаток может быть преодолен за счет использования коллоидного раствора химически модифицированных наночастиц серебра.

## Авторы

**Кудринский Алексей Александрович**, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории химии поверхности химического факультета Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, старший научный сотрудник Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», область интересов — химия и биологическая активность наноматериалов.

**Кондаков Сергей Эмильевич**, доктор фармацевтических наук, ведущий научный сотрудник кафедры химической кинетики химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, старший научный сотрудник Национального исследовательского технологического университета «МИСиС», область интересов — фармацевтическая химия и биологическая активность наноматериалов.

**Крутяков Юрий Андреевич**, кандидат химических наук, заведующий лабораторией функциональных наноматериалов для агропромышленного комплекса химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, старший научный сотрудник Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», область интересов — химия и биологическая активность наноматериалов.

## Литература

1. Ruotolo R., Maestri E., Pagano L., Marmiroli M., White J.C., Marmiroli N. Plant response to metal-containing engineered nanomaterials: an omics-based perspective. — *Environmental science & technology*, 2018, **52**(5), 2451.
2. Tripathi D.K., Tripathi A., Shweta, Singh S., Singh Y., Vishwakarma K., Yadav G., Sharma S., Singh V.K., Mishra R.K., Upadhyay R.G., Dubey N.K., Lee Y., Chauhan D.K. Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: a concentric review. — *Frontiers in microbiology*, 2017, **8**, 7.
3. Yang J., Cao W., Rui Y. Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms. — *Journal of Plant Interactions*, 2017, **12**(1), 158.
4. Дыкман Л.А., Щеголев С.Ю. Взаимодействие растений с наночастицами благородных металлов (обзор). — *Сельскохозяйственная биология*, 2017, **52**(1), 13.
5. Krutyakov Y.A., Kudrinskiy A.A., Olenin A.Y., Lisichkin G.V. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. — *Russian Chemical Reviews*, 2008, **77**(3), 233.
6. Batarseh K.I. Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver (I) chelation with glutamic and tartaric acids. — *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2004, **54**(2), 546.
7. Yamanaka M., Hara K., Kudo J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. — *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(11), 7589.
8. Davis I.J., Richards H., Mullany P. Isolation of silver- and antibiotic-resistant *Enterobacter cloacae* from teeth. — *Oral Microbiology and Immunology*, 2005, **20**(3), 191.

9. *Matsumura Y., Yoshikata K., Kunisaki S.-i., Tsuchido T.* Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. — *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(7), 4278.
10. *Balogh L., Swanson D.R., Tomalia D.A., Hagnauer G.L., McManus A.T.* Dendrimer-silver complexes and nanocomposites as antimicrobial agents. — *Nano Letters*, 2001, **1**(1), 18.
11. *Melaiye A., Sun Z., Hindi K., Milsted A., Ely D., Reneker D.H., Tessier C.A., Youngs W.J.* Silver(I)-imidazole cyclophane gem-diol complexes encapsulated by electrospun tecomophilic nanofibers: formation of nanosilver particles and antimicrobial activity. — *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**(7), 2285.
12. *Podsiadlo P., Paternel S., Rouillard J.M., Zhang Z., Lee J., Lee J.W., Gulari E., Kotov N.A.* Layer-by-layer assembly of nacre-like nanostructured composites with antimicrobial properties. — *Langmuir*, 2005, **21**, 11915.
13. *Sun R.W.-Y., Chen R., Chung N.P.-Y., Ho C.-M., Lin C.-L.S., Che C.-M.* Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. — *Chemical Communications*, 2005, **37**(40), 5059.
14. *Holt K.B., Bard A.J.* Interaction of silver(i) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag<sup>+</sup>. — *Biochemistry*, 2005, **44**, 13214.
15. *Silver S.* Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. — *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, **27**(2-3), 341.
16. *Silver S., Le Phung T., Silver G.* Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. — *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2006, **33**(7), 627.
17. *Clement J.L., Jarrett P.S.* Antibacterial Silver. — *Metal-Based Drugs*, 1994, **1**(5-6), 467.
18. *Wright G.D.* Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. — *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**(10), 1451.
19. *Kumar S.S.D., Rajendran N.K., Houreld N.N., Abrahamse H.* Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications. — *International journal of biological macromolecules*, 2018, **115**, 165.
20. *Ovais M., Ahmad I., Khalil A.T., Mukherjee S., Javed R., Ayaz M., Raza A., Shinwari Z.K.* Wound healing applications of biogenic colloidal silver and gold nanoparticles: recent trends and future prospects. — *Applied microbiology and biotechnology*, 2018, **102**(10), 4305.
21. *Cheng G., Dai M., Ahmed S., Hao H., Wang X., Yuan Z.* Antimicrobial drugs in fighting against antimicrobial resistance. — *Frontiers in microbiology*, 2016, **7**, 470
22. *Brennan S.A., Ní Fhoghlú C., Devitt B.M., O'Mahony F.J., Brabazon D., Walsh A.* Silver nanoparticles and their orthopaedic applications. *The bone & joint journal*, 2015, **97**-B(5), 582.
23. *Metelkin A., Frolov G., Kuznetsov D., Kondakov S. ets.* Metal nanoparticles in DBS card materials modification - IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2015, **98**, 012020, 1-5.
24. *Qin Y., Zhang S., Zhang L., Zhu D., Syed A.* Response of *in vitro* strawberry to silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>). — *HortScience*, 2005, **40**(3), 747.
25. *Gusev A.A., Akimova O.A., Zakharova O.V., Godymchuk A.Y., Krutyakov Y.A., Klimov A.I., Denisov A.N., Kuznetsov D.V.* Morphometric parameters and biochemical status of oilseed rape exposed to fine-dispersed metallurgical sludge, PHMB-stabilized silver nanoparticles and multi-wall carbon nanotubes. — *Advanced Materials Research*, 2014, **880**, 212.
26. *Gusev A., Kudrinsky A.A., Zakharova O.V., Klimov A.I., Zherebin P.M., Lisichkin G.V., Vasyukova I.A., Denisov A.N., Krutyakov Y.A.* Versatile synthesis of PHMB-stabilized



- silver nanoparticles and their significant stimulating effect on fodder beet (*Beta vulgaris* L.). — Materials science & engineering. C, 2016, **62**, 152.
27. Krutyakov Y.A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Yapryntsev A.D., Pobedinskaya M.A., Elansky S.N., Denisov A.N., Mikhaylov D.M., Lisichkin G.V. Tallow amphopolycarboxyglycinate-stabilized silver nanoparticles: new frontiers in development of plant protection products with a broad spectrum of action against phytopathogens. — Materials Research Express, 2016, **3**(7), 75403.
  28. Krutyakov Y.A., Kudrinskiy A.A., Gusev A.A., Zakharova O.V., Klimov A.I., Yapryntsev A.D., Zherebin P.M., Shapoval O.A., Lisichkin G.V. Synthesis of positively charged hybrid PHMB-stabilized silver nanoparticles: the search for a new type of active substances used in plant protection products. — Materials Research Express, 2017, **4**(7), 75018.
  29. Zakharova O.V., Gusev A.A., Zherebin P.M., Skripnikova E.V., Skripnikova M.K., Ryzhikh V.E., Lisichkin G.V., Shapoval O.A., Bukovskii M.E., Krutyakov Y.A. Sodium tallow amphopolycarboxyglycinate-stabilized silver nanoparticles suppress early and late blight of *Solanum lycopersicum* and stimulate the growth of tomato plants. — Bio-NanoScience, 2017, **7**(4), 692.
  30. Иващенко В.В., Гарифзянов А.Р. Антиоксидантная система как основа устойчивости растений. — Саарбрюкен: LAP LAMBERT, 2012. — 191 с.
  31. Гарифзянов А.Р., Жуков Н.Н., Иващенко В.В. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений. — Современные проблемы науки и образования, 2011, **2**, 2.
  32. Xu H., Qu F., Xu H., Lai W., Andrew Wang Y., Aguilar Z.P., Wei H. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7. Biometals, 2012, **25**(1), 45.
  33. Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. — Discussions of the Faraday Society, 1951, **11**, 55.
  34. Henglein A., Giersig M. Formation of colloidal silver nanoparticles: capping action of citrate. — J. Phys. Chem. B, 1999, **103**, 9533.
  35. Henglein A. Colloidal silver nanoparticles: photochemical preparation and interaction with O<sub>2</sub>, CCl<sub>4</sub>, and some metal ions. — Chem. Mater., 1998, **10**, 444.
  36. Xiong Y., Washio I., Chen J., Sadilek M., Xia Y. Trimeric clusters of silver in aqueous AgNO<sub>3</sub> solutions and their role as nuclei in forming triangular nanoplates of silver. — Angewandte Chemie International Edition, 2007, **46**(26), 4917.
  37. Henglein A. Reactions of organic free radicals at colloidal silver in aqueous solution. Electron pool effect and water decomposition. — The Journal of Physical Chemistry, 1979, **83**(17), 2209.
  38. Meisel D. Catalysis of hydrogen production in irradiated aqueous solutions by gold sols. — Journal of the American Chemical Society, 1979, **101**(20), 6133.
  39. Henglein A. Electrochemical reactions of some organic free radicals at colloidal silver in aqueous solution. — The Journal of Physical Chemistry, 1980, **84**(25), 3461.
  40. Henglein A., Lilie J. Storage of electrons in aqueous solution: the rates of chemical charging and discharging the colloidal silver microelectrode. — Journal of the American Chemical Society, 1981, **103**(5), 1059.
  41. Evanoff D.D., Chumanov G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. — ChemPhysChem, 2005, **6**(7), 1221.
  42. Creighton J.A., Blatchford C.G., Albrecht M.G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. — Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2, 1979, **75**, 790.

43. *Lee P.C., Meisel D.* Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. — *The Journal of Physical Chemistry*, 1982, **86**(17), 3391.
44. *Губин С.П., Катаева Н.А.* Координационная химия наночастиц. — *Коорд. Хим.*, 2006, **32**, 883.
45. *Yonezawa T., Onoue S.-Y., Kimizuka N.* Preparation of highly positively charged silver nanoballs and their stability. — *Langmuir*, 2000, **16**(12), 5218.
46. *Doty R.C., Tshikhudo T.R., Brust M., Fernig D.G.* Extremely stable water-soluble Ag nanoparticles. — *Chemistry of Materials*, 2005, **17**(18), 4630.
47. *Zou X., Bao H., Guo H., Zhang L., Qi L., Jiang J., Niu L., Dong S.* Mercaptoethane sulfonate protected, water-soluble gold and silver nanoparticles: syntheses, characterization and their building multilayer films with polyaniline via ion-dipole interactions. — *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, **295**(2), 401.
48. *Zhao S., Zhang K., An J., Sun Y., Sun C.* Synthesis and layer-by-layer self-assembly of silver nanoparticles capped by mercaptosulfonic acid. — *Materials Letters*, 2006, **60**(9-10), 1215.
49. *Zhao S., Zhang K., Sun Y., Sun C.* Hemoglobin/colloidal silver nanoparticles immobilized in titania sol-gel film on glassy carbon electrode: Direct electrochemistry and electrocatalysis. — *Bioelectrochemistry*, 2006, **69**(1), 10.
50. *Li X., Zhang J., Xu W., Jia H., Wang X., Yang B., Zhao B., Li B., Ozaki Y.* Mercaptoacetic acid-capped silver nanoparticles colloid: formation, morphology, and SERS activity. — *Langmuir*, 2003, **19**(10), 4285.
51. *Liu J., Lee J.-B., Kim D.-H., Kim Y.* Preparation of high concentration of silver colloidal nanoparticles in layered laponite sol. — *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007, **302**(1-3), 276.
52. *Brust M., Walker M., Schiffrin D.J., Whyman R.* Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. — *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1994, 801.
53. *Sandhyarani N., Resmi M.R., Unnikrishnan R., Vidyasagar K., Ma S., Antony M.P., Selvam G.P., Visalakshi V., Chandrakumar N., Pandian K., Tao Y.-T., Pradeep T.* Monolayer-protected cluster superlattices: structural, spectroscopic, calorimetric, and conductivity studies. — *Chemistry of Materials*, 2000, **12**(1), 104.
54. *He S., Yao J., Xie S., Pang S., Gao H.* Investigation of passivated silver nanoparticles. — *Chemical Physics Letters*, 2001, **343**(1-2), 28.
55. *Kiely C.J., Fink J., Zheng J.G., Brust M., Bethell D., Schiffrin D.J.* Ordered colloidal nanoalloys. — *Advanced Materials*, 2000, **12**(9), 640.
56. *Lahtinen R.M., Mertens S.F.L., East E., Kiely C.J., Schiffrin D.J.* Silver halide colloid precursors for the synthesis of monolayer-protected clusters. — *Langmuir*, 2004, **20**, 3289.
57. *Husein M., Rodil E., Vera J.* Formation of silver chloride nanoparticles in microemulsions by direct precipitation with the surfactant counterion. — *Langmuir*, 2003, **19**(20), 8467.
58. *Mulvaney P.* Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. — *Langmuir*, 1996, **12**, 788.
59. *Manna A., Imae T., Iida M., Hisamatsu N.* Formation of silver nanoparticles from a n-hexadecylethylenediamine silver nitrate complex. — *Langmuir*, 2001, **17**(19), 6000.
60. *Waters C.A., Mills A.J., Johnson K.A., Schiffrin D.J.* Purification of dodecanethiol derivatised gold nanoparticles. — *Chemical Communications*, 2003(4), 540.
61. *Lee K.J., Lee Y.-I., Shim I.-K., Joung J., Oh Y.S.* Direct synthesis and bonding origins of monolayer-protected silver nanocrystals from silver nitrate through *in situ* ligand exchange. — *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, **304**(1), 92.
62. *Cheng W., Wang E.* Size-dependent phase transfer of gold nanoparticles from water into toluene by tetraoctylammonium cations: a wholly electrostatic interaction. — *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 24.

63. Yang Y., Liu S., Kimura K. Cyclodextrin as a capturing agent for redundant surfactants on Ag nanoparticle surface in phase transfer process. — *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, **290**(1–3), 143.
64. Оленин А.Ю., Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Лисичкин Г.В. Формирование поверхностного слоя наночастиц серебра в водных и водно-органических средах. — *Коллоидный журнал*, 2008, **70**, 1, 78.
65. Yin Y., Li Z.-Y., Zhong Z., Gates B., Xia Y., Venkateswaran S. Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process. — *Journal of Materials Chemistry*, 2002, **12**(3), 522.
66. Panigrahi S., Kundu S., Ghosh S., Nath S., Pal T. General method of synthesis for metal nanoparticles. — *Journal of Nanoparticle Research*, 2004, **6**(4), 411.
67. Qu L., Dai L. Novel silver nanostructures from silver mirror reaction on reactive substrates. — *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, **109**(29), 13985.
68. Panáček A., Kvítek L., Prucek R., Kolář M., Veeová R., Pizúrová N., Sharma V.K., Nevná T. J., Zbořil R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. — *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, **110**(33), 16248.
69. Anh-Tuan L., Huy P.T., Tran Q.H., Phung D.C., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В., Крутяков Ю.А. Фотохимический синтез наночастиц серебра, обладающих высокой антибактериальной активностью. — *Российские нанотехнологии*, 2010, **5**, 75.
70. Anh-Tuan L., Thi T.L., Phuong D.T., Huy P.T., Tran Q.H., Nguyen V.H., Kudrinskiy A.A., Krutyakov Y.A. Synthesis of oleic acid-stabilized silver nanoparticles and analysis of their antibacterial activity. — *Materials Science and Engineering C*, 2010, **30**, 910.
71. Anh-Tuan L., Huy P.T., Phuong D.T., Tran Q.H., Phung D.C., Kudrinskiy A.A., Krutyakov Y.A. Green synthesis of finely-dispersed highly bactericidal silver nanoparticles via modified tollens technique. — *Current Applied Physics*, 2010, **10**, 910.
72. Hsu S.L.-C., Wu R.-T. Synthesis of contamination-free silver nanoparticle suspensions for micro-interconnects. — *Materials Letters*, 2007, **61**(17), 3719.
73. Chandran S.P., Chaudhary M., Pasricha R., Ahmad A., Sastry M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract. — *Biotechnology Progress*, 2006, **22**(2), 577.
74. Shankar S.S., Ahmad A., Sastry M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. — *Biotechnology Progress*, 2003, **19**(6), 1627.
75. Silvert P.-Y., Herrera-Urbina R., Duvauchelle N., Vijayakrishnan V., Elhsissen K.T. Preparation of colloidal silver dispersions by the polyol process. Part 1 — synthesis and characterization. — *J. Mater. Chem.*, 1996, **6**(4), 573.
76. Wang X., Zhuang J., Peng Q., Li Y. A general strategy for nanocrystal synthesis. — *Nature*, 2005, **437**(7055), 121.
77. Sun Y., Xia Y. Large-scale synthesis of uniform silver nanowires through a soft, self-seeding, polyol process. — *Advanced Materials*, 2002, **14**(11), 833.
78. Chen Z., Gao L. A facile and novel way for the synthesis of nearly monodisperse silver nanoparticles. — *Materials Research Bulletin*, 2007, **42**(9), 1657.
79. Pastoriza-Santos I., Liz-Marzán L.M. Binary cooperative complementary nanoscale interfacial materials. Reduction of silver nanoparticles in DMF. Formation of monolayers and stable colloids. — *Pure and Applied Chemistry*, 2000, **72**(1-2), 83.
80. Green M., Allsop N., Wakefield G., Dobson P.J., Hutchison J.L. Trialkylphosphine oxide/amine stabilised silver nanocrystals — the importance of steric factors and Lewis basicity in capping agents. — *J. Mater. Chem.*, 2002, **12**(9), 2671.
81. Kim S.-W., Park J., Jang Y., Chung Y., Hwang S., Hyeon T., Kim Y.W. Synthesis of monodisperse palladium nanoparticles. — *Nano Letters*, 2003, **3**(9), 1289.

82. *Bunge S.D., Boyle T.J., Headley T.J.* Synthesis of coinage-metal nanoparticles from mesityl precursors. — *Nano Letters*, 2003, **3**(7), 901.
83. *Boutonnet M., Kizling J., Stenius P., Maire G.* The preparation of monodisperse colloidal metal particles from microemulsions. — *Colloids and Surfaces*, 1982, **5**(3), 209.
84. *Kurihara K., Kizling J., Stenius P., Fendler J.H.* Laser and pulse radiolytically induced colloidal gold formation in water and in water-in-oil microemulsions. — *Journal of the American Chemical Society*, 1983, **105**(9), 2574.
85. *Ravet I., Nagy J.B., Derouane E.G.* On the mechanism of formation of colloidal monodisperse metal boride particles from reversed micelles composed of CTAB-1-hexanol-water. *Surf. Sci. Catal.*, 1987, **31**, 505.
86. *Osseo-Asare K., Arriagada F.* Synthesis of nanosize particles in reverse microemulsions. — *Ceram. Trans.*, 1990, **12**, 3.
87. *Towey T.F., Khan-Lodhi A., Robinson B.H.* Kinetics and mechanism of formation of quantum-sized cadmium sulphide particles in water-Aerosol-OT-oil microemulsions. — *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1990, **86**(22), 3757.
88. *Hirai T., Sato H., Komazawa I.* Mechanism of formation of titanium dioxide ultrafine particles in reverse micelles by hydrolysis of titanium tetrabutoxide. — *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 1993, **32**(12), 3014.
89. *López-Quintela M.A., Rivas J.* Chemical reactions in microemulsions: a powerful method to obtain ultrafine particles. — *Journal of Colloid and Interface Science*, 1993, **158**(2), 446.
90. *Bandoyopadhyaya R., Kumar R., Gandhi K.S.* Modeling of precipitation in reverse micellar systems. — *Langmuir*, 1997, **13**, 3610.
91. *Schmidt J., Guesdon C., Schomäcker R.* Engineering aspects of preparation of nanocrystalline particles in microemulsions. — *Journal of Nanoparticle Research*, 1999, **1**(2), 267.
92. *Barnickel P., Wokaun A.* Synthesis of metal colloids in inverse microemulsions. — *Molecular Physics*, 1990, **69**(1), 1.
93. *Barnickel P., Wokaun A., Sager W., Eicke H.-F.* Size tailoring of silver colloids by reduction in microemulsions. — *Journal of Colloid and Interface Science*, 1992, **148**(1), 80.
94. *Pileni M.-P., Zemb T., Petit C.* Solubilization by reverse micelles: solute localization and structure perturbation. — *Chemical Physics Letters*, 1985, **118**(4), 414.
95. *Fendler J.H.* Atomic and molecular clusters in membrane mimetic chemistry. — *Chemical Reviews*, 1987, **87**(5), 877.
96. *Petit C., Lixon P., Pileni M.P.* *In situ* synthesis of silver nanocluster in AOT reverse micelles. — *The Journal of Physical Chemistry*, 1993, **97**(49), 12974.
97. *Taleb A., Petit C., Pileni M.P.* Synthesis of highly monodisperse silver nanoparticles from AOT reverse micelles: a way to 2D and 3D self-organization. — *Chemistry of Materials*, 1997, **9**(4), 950.
98. *Prasad B.L.V., Arumugam S.K., Bala T., Sastry M.* Solvent-adaptable silver nanoparticles. — *Langmuir*, 2005, **21**, 822.
99. *Wang W., Efrima S., Regev O.* Directing oleate stabilized nanosized silver colloids into organic phases. — *Langmuir*, 1998, **14**, 602.
100. *Wang W., Chen X., Efrima S.* Silver nanoparticles capped by long-chain unsaturated carboxylates. *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 7238.
101. *Ghosh S.K., Kundu S., Mandal M., Nath S., Pal T.* Studies on the evolution of silver nanoparticles in micelle by UV-photoactivation. — *Journal of Nanoparticle Research*, 2003, **5**(5/6), 577.
102. *Xu J., Han X., Liu H., Hu Y.* Synthesis and optical properties of silver nanoparticles stabilized by gemini surfactant. — *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, **273**(1-3), 179.

103. Zana R. Dimeric (gemini) surfactants: effect of the spacer group on the association behavior in aqueous solution. — *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002, **248**(2), 203.
104. Kitamoto D.A.I., Isoda H., Nakahara T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants — from energy-saving materials to gene delivery carriers. — *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, **94**(3), 187.
105. Xie Y.-W., Li Y., Ye R.-Q. Effect of alcohols on the phase behavior of microemulsions formed by a biosurfactant — rhamnolipid. — *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2005, **26**(4), 455.
106. Xie Y., Ye R., Liu H. Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant. — *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, **279**(1-3), 175.
107. Heath J.R., Knobler C.M., Leff D.V. Pressure/temperature phase diagrams and superlattices of organically functionalized metal nanocrystal monolayers: the influence of particle size, size distribution, and surface passivant. — *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 189.
108. Swami A., Selvakannan P., Pasricha R., Sastry M. One-step synthesis of ordered two-dimensional assemblies of silver nanoparticles by the spontaneous reduction of silver ions by pentadecylphenol Langmuir monolayers. — *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004, **108**(50), 19269.
109. Zhang L., Shen Y., Xie A., Li S., Jin B., Zhang Q. One-step synthesis of monodisperse silver nanoparticles beneath vitamin E Langmuir monolayers. — *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, **110**(13), 6615.
110. Lisiecki I., Pileni M.P. Copper metallic particles synthesized "in situ" in reverse micelles: influence of various parameters on the size of the particles. — *The Journal of Physical Chemistry*, 1995, **99**(14), 5077.
111. Bagwe R.P., Khilar K.C. Effects of intermicellar exchange rate on the formation of silver nanoparticles in reverse microemulsions of AOT. — *Langmuir*, 2000, **16**(3), 905.
112. Bulavchenko A.I., Arymbaeva A.T., Demidova M.G., Popovetskiy P.S., Plyusnin P.E., Bulavchenko O.A. Synthesis and concentration of organosols of silver nanoparticles stabilized by AOT: emulsion versus microemulsion. — *Langmuir*, 2018, **34**(8), 2815.
113. Cason J.P., Khambaswadkar K., Roberts C.B. Supercritical fluid and compressed solvent effects on metallic nanoparticle synthesis in reverse micelles. — *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2000, **39**(12), 4749.
114. Cason J.P., Roberts C.B. Metallic copper nanoparticle synthesis in AOT reverse micelles in compressed propane and supercritical ethane solutions. — *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 1217.
115. Johnston K.P., Harrison K.L., Clarke M.J., Howdle S.M., Heitz M.P., Bright F.V., Carlier C., Randolph T.W. Water-in-carbon dioxide microemulsions: an environment for hydrophiles including proteins. — *Science*, 1996, **271**(5249), 624.
116. Liu Z.-T., Erkey C. Water in carbon dioxide microemulsions with fluorinated analogues of AOT. — *Langmuir*, 2001, **17**(2), 274.
117. Zielinski R.G., Kline S.R., Kaler E.W., Rosov N. A small-angle neutron scattering study of water in carbon dioxide microemulsions. — *Langmuir*, 1997, **13**(15), 3934.
118. Jacobson G.B., Lee C.T., Johnston K.P. Organic synthesis in water/carbon dioxide microemulsions. — *The Journal of Organic Chemistry*, 1999, **64**(4), 1201.
119. Ji M., Chen X., Wai C.M., Fulton J.L. Synthesizing and dispersing silver nanoparticles in a water-in-supercritical carbon dioxide microemulsion. — *Journal of the American Chemical Society*, 1999, **121**(11), 2631.
120. Sun Y.-P., Atornigitiawat P., Meziari M.J. Preparation of silver nanoparticles via rapid expansion of water in carbon dioxide microemulsion into reductant solution. — *Langmuir*, 2001, **17**(19), 5707.

121. *Ohde H., Hunt F., Wai C.M.* Synthesis of silver and copper nanoparticles in a water-in-supercritical-carbon dioxide microemulsion. — *Chemistry of Materials*, 2001, **13**(11), 4130.
122. *Shah P.S., Holmes J.D., Doty R.C., Johnston K.P., Korgel B.A.* Steric stabilization of nanocrystals in supercritical CO<sub>2</sub> using fluorinated ligands. — *Journal of the American Chemical Society*, 2000, **122**(17), 4245.
123. *Kameo A., Yoshimura T., Esumi K.* Preparation of noble metal nanoparticles in supercritical carbon dioxide. — *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2003, **215**(1-3), 181.
124. *McLeod M.C., McHenry R.S., Beckman E.J., Roberts C.B.* Synthesis and stabilization of silver metallic nanoparticles and premetallic intermediates in perfluoropolyether/CO<sub>2</sub> reverse micelle systems. — *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, **107**(12), 2693.
125. *Pyatenko A., Shimokawa K., Yamaguchi M., Nishimura O., Suzuki M.* Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in pure water. — *Applied Physics A*, 2004, **79**(4-6), 803.
126. *Simakin A.V., Voronov V.V., Kirichenko N.A., Shafeev G.A.* Nanoparticles produced by laser ablation of solids in liquid environment. — *Applied Physics A*, 2004, **79**(4-6), 1127.
127. *Ganeev R.A., Baba M., Rysanyansky A.I., Suzuki M., Kuroda H.* Characterization of optical and nonlinear optical properties of silver nanoparticles prepared by laser ablation in various liquids. — *Optics Communications*, 2004, **240**(4-6), 437.
128. *Tsuji T., Kakita T., Tsuji M.* Preparation of nano-size particles of silver with femtosecond laser ablation in water. — *Applied Surface Science*, 2003, **206**(1-4), 314.
129. *Shafeev G.A., Freysz E., Bozon-Verduraz F.* Self-influence of a femtosecond laser beam upon ablation of Ag in liquids. — *Applied Physics A*, 2004, **78**(3), 307.
130. *Chen Y.-H., Yeh C.-S.* Laser ablation method: use of surfactants to form the dispersed Ag nanoparticles. — *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002, **197**(1-3), 133.
131. *Amendola V., Polizzi S., Meneghetti M.* Free silver nanoparticles synthesized by laser ablation in organic solvents and their easy functionalization. — *Langmuir*, 2007, **23**(12), 6766.
132. *Nichols W.T., Malyavanatham G., Henneke D.E., Brock J.R., Becker M.F., Keto J.W., Glicksman H.D.* Gas and pressure dependence for the mean size of nanoparticles produced by laser ablation of flowing aerosols. — *Journal of Nanoparticle Research*, 2000, **2**(2), 141
133. *Nichols W.T., Keto J.W., Henneke D.E., Brock J.R., Malyavanatham G., Becker M.F., Glicksman H.D.* Large-scale production of nanocrystals by laser ablation of microparticles in a flowing aerosol. — *Applied Physics Letters*, 2001, **78**(8), 1128.
134. *Lee J., Becker M.F., Keto J.W.* Dynamics of laser ablation of microparticles prior to nanoparticle generation. — *Journal of Applied Physics*, 2001, **89**(12), 8146.
135. *Mafuné F., Kohno J., Takeda Y., Kondow T.* Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution. — *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 9111.
136. *Ershov B.G., Henglein A.* Time-resolved investigation of early processes in the reduction of Ag<sup>+</sup> on polyacrylate in aqueous solution. — *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102**, 10663.
137. *Henglein A.* Physicochemical properties of small metal particles in solution: "micro-electrode" reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition. — *The Journal of Physical Chemistry*, 1993, **97**(21), 5457.
138. *Janata E., Henglein A., Ershov B.G.* First clusters of Ag<sup>+</sup> ion reduction in aqueous solution. — *The Journal of Physical Chemistry*, 1994, **98**(42), 10888.
139. *Xu X., Yin Y., Ge X., Wu H., Zhang Z.*  $\gamma$ -Radiation synthesis of poly(acrylic acid)-metal nanocomposites. — *Materials Letters*, 1998, **37**(6), 354.
140. *Zhu Y., Qian Y., Li X., Zhang M.*  $\gamma$ -Radiation synthesis and characterization of polyacrylamide-silver nanocomposites. — *Chemical Communications*, 1997 (12), 1081.

141. *Choi S.-H., Lee S.-H., Hwang Y.-M., Lee K.-P., Kang H.-D.* Interaction between the surface of the silver nanoparticles prepared by  $\gamma$ -irradiation and organic molecules containing thiol group. — *Radiation Physics and Chemistry*, 2003, **67**(3-4), 517.
142. *Jacob J.A., Kapoor S., Biswas N., Mukherjee T.* Size tunable synthesis of silver nanoparticles in water-ethylene glycol mixtures. — *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007, **301**(1-3), 329.
143. *Soroushian B., Lampre I., Belloni J., Mostafavi M.* Radiolysis of silver ion solutions in ethylene glycol: solvated electron and radical scavenging yields. — *Radiation Physics and Chemistry*, 2005, **72**(2-3), 111.
144. *Hund J.F., Bertino M.F., Zhang G., Sotiriou-Leventis C., Leventis N., Tokuhiko A.T., Farmer J.* Formation and entrapment of noble metal clusters in silica aerogel monoliths by  $\gamma$ -radiolysis. — *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, **107**(2), 465.
145. *Lawless D., Kapoor S., Kenepohl P., Meisel D., Serpone N.* Reduction and aggregation of silver ions at the surface of colloidal silica. — *The Journal of Physical Chemistry*, 1994, **98**(38), 9619.
146. *Sárkány A., Sajó I., Hargittai P., Papp Z., Tombácz E.* Styrene oxide transformation on SiO<sub>2</sub>-stabilised Ag nanoparticles prepared by gamma-radiolysis. — *Applied Catalysis A: General*, 2005, **293**, 41.
147. *Ramrani S.P., Biswal J., Sabharwal S.* Synthesis of silver nanoparticles supported on silica aerogel using gamma radiolysis. — *Radiation Physics and Chemistry*, 2007, **76**(8-9), 1290.
148. *Chen P., Song L., Liu Y., Fang Y.-E.* Synthesis of silver nanoparticles by  $\gamma$ -ray irradiation in acetic water solution containing chitosan. — *Radiation Physics and Chemistry*, 2007, **76**(7), 1165.
149. *Andrews M.P., Ozin G.A.* Wrapping oligomers and polymers around metal atoms, metal clusters, and metal colloids. — *Chemistry of Materials*, 1989, **1**(2), 174.
150. *Ozin G.A., Huber H., Mitchell S.A.* Selective, naked cluster cryophotocchemistry: trisilver, Ag<sub>3</sub>. — *Inorganic Chemistry*, 1979, **18**(10), 2932.
151. *Артемов А.В., Жильцов В.А., Крутяков Ю.А., Иванов М.Н., Переславцев А.В., Петрова М.В., Тимофеев А.В., Шеляков О.В.* Получение наноразмерных металлов электрическим разрядом в жидкости. — *Вопросы атомной науки и техники. Сер.: Плазменная электроника и новые методы ускорения*, 2008, **4**, 150.
152. *Mitchell S.A., Kenney-Wallace G.A., Ozin G.A.* Disilver: spectroscopy and photoprocesses in rare-gas matrixes. — *Journal of the American Chemical Society*, 1981, **103**(20), 6030.
153. *Huber H., Mackenzie P., Ozin G.A.* Silver atoms and small silver clusters in ice and wax matrix supports. — *Journal of the American Chemical Society*, 1980, **102**(5), 1548.
154. *Новожилов Ю.А., Лучина М.А.* Адсорбция жирных кислот и спиртов на высокодисперсном никеле. — *Журн. Физ. Хим.*, 1968, **42**, 2114.
155. *Bredig G.* Einige Anwendungen des elektrischen Lichtbogens. — *Zeitschrift für Elektrotechnik und Elektrochemie*, 1898, **4**(22), 514.
156. *Svedberg T.* Zur Kenntnis der elektrischen Kolloidsynthese. — *Kolloid-Zeitschrift*, 1919, **24**(1), 1.
157. *Московиц М., Озин Г.* Криохимия. М.: Мир, 1979. — 595 с.
158. *Chemistry and physics of matrix isolated species/ Edited by. L. Andrews, M. Moskovits.* Amsterdam: North Holland, 1989. — 430 p.
159. *Klabunde K.J.* Chemistry of free atoms and particles. — New-York: Academic Press, 1980. — 238 p.
160. *Kondakov S.E., Smirnov V.V., Olenin A.Y.* Low temperature synthesis of metal nanometer scale particles in triethylamine medium. — *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, 1995, **104**(6), 369.

161. *Vasil'kov A.Y., Olenin A.Y., Titova E.F., Sergeev V.A.* Peculiarities of cobalt nanometer scale particle nucleation on an alumina surface. — *Journal of Colloid and Interface Science*, 1995, **169**(2), 356.
162. *Лутина М.А., Новожилов Ю.А.* Электрический конденсационный способ получения органодисперсий металлов. — *Колл. Журн.*, 1969, **31**, 467.
163. *Тепанов А.А., Крутяков Ю.А., Лисичкин Г.В.* Электрический разряд в жидкости как метод получения высокодисперсных материалов на основе металлов IB группы. — *Российский химический журнал*, 2013, **56**, 18.
164. *Nizatov T.R., Evstafiev I.V., Olenin A.Y., Knot'ko A.V., Lisichkin G.V.* Anisotropic growth of silver nanoparticles on preliminarily synthesized seeds. — *Nanotechnologies in Russia*, 2014, **9**(7-8), 391.
165. *Sun Y., Yin Y., Mayers B.T., Herricks T., Xia Y.* Uniform silver nanowires synthesis by reducing AgNO<sub>3</sub> with ethylene glycol in the presence of seeds and poly(vinyl pyrrolidone). — *Chemistry of Materials*, 2002, **14**(11), 4736.
166. *Bai J., Qin Y., Jiang C., Qi L.* Polymer-controlled synthesis of silver nanobelts and hierarchical nanocolumns. — *Chemistry of Materials*, 2007, **19**(14), 3367.
167. *Jana N.R., Gearheart L., Murphy C.J.* Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio. — *Chemical Communications*, 2001 (7), 617.
168. *Wiley B., Sun Y., Mayers B., Xia Y.* Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: the case of silver. — *Chemistry A European Journal*, 2005, **11**(2), 454.
169. *Yener D.O., Sindel J., Randall C.A., Adair J.H.* Synthesis of nanosized silver platelets in octylamine-water bilayer systems. — *Langmuir*, 2002, **18**(22), 8692.
170. *Yu D., Yam V.W.-W.* Controlled synthesis of monodisperse silver nanocubes in water. — *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**(41), 13200.
171. *Huang L.M., Wang H.T., Wang Z.B., Mitra A., Bozhilov K.N., Yan Y.S.* Nanowire arrays electrodeposited from liquid crystalline phases. — *Advanced Materials*, 2002, **14**(1), 61.
172. *Wei G., Zhou H., Liu Z., Song Y., Wang L., Sun L., Li Z.* One-step synthesis of silver nanoparticles, nanorods, and nanowires on the surface of DNA network. — *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, **109**(18), 8738.
173. *Zhang S.-H., Xie Z.-X., Jiang Z.-Y., Xu X., Xiang J., Huang R.-B., Zheng L.-S.* Synthesis of silver nanotubes by electroless deposition in porous anodic aluminium oxide templates. — *Chemical Communications*, 2004 (9), 1106.
174. *Drury A., Chaure S., Kröll M., Nicolosi V., Chaure N., Blau W.J.* Fabrication and characterization of silver/polyaniline composite nanowires in porous anodic alumina. — *Chemistry of Materials*, 2007, **19**(17), 4252.
175. *Ino S.* Epitaxial growth of metals on rocksalt faces cleaved in vacuum. II. Orientation and structure of gold particles formed in ultrahigh vacuum. — *Journal of the Physical Society of Japan*, 1966, **21**(2), 346.
176. *Ino S., Ogawa S.* Multiply twinned particles at earlier stages of gold film formation on alkali halide crystals. — *Journal of the Physical Society of Japan*, 1967, **22**(6), 1365.
177. *Marks L.D.* Experimental studies of small particle structures. — *Reports on Progress in Physics*, 1994, **57**(6), 603.
178. *Murphy C.J., Gole A.M., Hunyadi S.E., Orendorff C.J.* One-dimensional colloidal gold and silver nanostructures. — *Inorganic Chemistry*, 2006, **45**(19), 7544.
179. *Sun Y., Gates B., Mayers B., Xia Y.* Crystalline silver nanowires by soft solution processing. — *Nano Letters*, 2002, **2**(2), 165.
180. *Olenin A.Y., Krutyakov Y.A., Lisichkin G.V.* Formation mechanisms of anisotropic silver nanostructures in polyol synthesis. — *Nanotechnologies in Russia*, 2010, **5**(5-6), 421.



181. Zou X., Ying E., Chen H., Dong S. An approach for synthesizing nanometer- to micrometer-sized silver nanoplates. — *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007, **303**(3), 226.
182. Ledwith D.M., Whelan A.M., Kelly J.M. A rapid, straight-forward method for controlling the morphology of stable silver nanoparticles. — *J. Mater. Chem.*, 2007, **17**(23), 2459.
183. Chen S., Fan Z., Carroll D.L. Silver nanodisks: synthesis, characterization, and self-assembly. — *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, **106**(42), 10777.
184. Jin R., Cao Y.W., Mirkin C.A., Kelly K.L., Schatz G.S., Zheng J.G. Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. — *Science*, 2001, **294**(5548), 1901.
185. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramírez J.T., Yacaman M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. — *Nanotechnology*, 2005, **16**(10), 2346.
186. Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. — *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, **275**(1), 177.
187. Lakowicz J.R., Gryczynski I., Malicka J., Gryczynski Z., Geddes C.D. Enhanced and localized multiphoton excited fluorescence near metallic silver islands: metallic islands can increase probe photostability. — *Journal of Fluorescence*, 2002, **12**(3/4), 299.
188. Lok C.-N., Ho C.-M., Chen R., He Q.-Y., Yu W.-Y., Sun H., Tam P.K.-H., Chiu J.-F., Che C.-M. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. — *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2007, **12**(4), 527.
189. Klaus T., Joerger R., Olsson E., Granqvist C.-G. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. — *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, **96**(24), 13611.
190. Gupta A., Matsui K., Lo J.-F., Silver S. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. — *Nature Medicine*, 1999, **5**(2), 183.
191. Li X.Z., Nikaido H., Williams K.E. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of  $\text{Ag}^+$  and are deficient in porins. — *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(19), 6127.
192. Burda C., Chen X., Narayanan R., El-Sayed M.A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. — *Chemical Reviews*, 2005, **105**(4), 1025.
193. Pal S., Tak Y.K., Song J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. — *Applied and environmental microbiology*, 2007, **73**(6), 1712.
194. Shahverdi A.R., Fakhimi A., Shahverdi H.R., Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. — *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2007, **3**(2), 168.
195. Fu J., Ji J., Fan D., Shen J. Construction of antibacterial multilayer films containing nanosilver via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan-silver ions complex. — *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, **79**(3), 665.
196. Rhim J.-W., Hong S.-I., Park H.-M., Ng P.K.W. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. — *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**(16), 5814.
197. Lee H.J., Yeo S.Y., Jeong S.H. Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics. — *J. Mater. Sci.*, **38**, 2199 (2003).
198. Ye W., Leung M.F., Xin J., Kwong T.L., Lee D.K.L., Li P. Novel core-shell particles with poly(n-butyl acrylate) cores and chitosan shells as an antibacterial coating for textiles. — *Polymer*, 2005, **46**(23), 10538.

199. *Dubas S.T., Kumlangdudsana P., Potiyaraj P.* Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers. — *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, **289**(1-3), 105.
200. *Lee H.J., Jeong S.H.* Bacteriostasis and skin innocuousness of nanosize silver colloids on textile fabrics. — *Textile Research Journal*, 2005, **75**(7), 551.
201. *Krutyakov Y.A., Zherebin P.M., Kudrinskiy A.A., Zubavichus Y.V., Presniakov M.Y., Yapruntsev A.D., Karabtseva A.V., Mikhaylov D.M., Lisichkin G.V.* New frontiers in water purification: highly stable amphopoly-carboxyglycinate-stabilized Ag-AgCl nanocomposite and its newly discovered potential. — *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2016, **49**(37), 375501.
202. *Бидевкина М.В., Рысина Т.З., Русаков В.Н., Караев А.Л., Лиманцев А.В., Алексеева Ж.П., Шушков М.Ю., Жеребин П.М., Крутяков Ю.А.* Использование комбинации нанокompозита серебра и перекиси водорода для обеззараживания воды бассейнов. — *Дезинфекционное дело*, 2016, **96**, 2, 12.
203. *Klimov A.I., Zherebin P.M., Gusev A.A., Kudrinskiy A.A., Krutyakov Y.A.* The silver ions contribution into the cytotoxic activity of silver and silver halides nanoparticles. — *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2015, **98**, 12034.
204. *Kudrinskiy A.A., Ivanov A.Y., Kulakovskaya E.V., Klimov A.I., Zherebin P.M., Khodarev D.V., Le A.-T., Le Tam T., Lisichkin G.V., Krutyakov Y.A.* The mode of action of silver and silver halides nanoparticles against *Saccharomyces cerevisiae* cells. — *Journal of Nanoparticles*, 2014, **2014**(2), 1.
205. *Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Лисичкин Г.В., Вертелов Г.К., Мажуга А.Г.* Антибактериальный препарат и способ его получения. — Патент РФ, №2419439, 2011.
206. *Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В.* Дезинфицирующее средство для обработки кожных покровов. — Патент Российской Федерации, 2011, 2427380.
207. *Krutyakov Y., Klimov A., Violin B., Kuzmin V., Ryzhikh V., Gusev A., Zakharova O., Lisichkin G.* Benzyldimethyl[3-(mristoylamino)-propyl.]ammonium chloride stabilized silver nanoparticles (Argumistin<sup>TM</sup>) in medicine: results of clinical trials for treatment of infectious diseases of dogs and perspectives for humans. — *European Journal of Nanomedicine*, 2016, **8**(4), 131.
208. *Симонов П.Г., Ашенбреннер А.И., Хаперский Ю.А., Виолин Б.В., Крутяков Ю.А.* Изучение терапевтической эффективности нового антибактериального препарата Аргумистин<sup>®</sup> при различных формах мастита коров. — *Аграрная наука*, 2016, **6**, 17.
209. *Крутяков Ю.А., Коптев В.Ю., Кудринский А.А., Климов А.И., Титова М.А., Бальбина Н.Ю., Лисичкин Г.В.* Определение содержания серебра в тканях и органах цыплят-бройлеров после орального и ингаляционного применения водных дисперсий коллоидного серебра. — *Гигиена и санитария*, 2016, **95**, 2, 207.
210. *Симонов П.Г., Ашенбреннер А.И., Виолин Б.В., Федотов С.В., Малышев А.А., Крутяков Ю.А.* Применение нового антибактериального препарата Аргумистин при терапии высокопродуктивных коров с послеродовым гнойно-катаральным эндометритом. — *Ветеринария*, 2016, **12**, 17.
211. *Крутяков Ю.А., Климов А.И., Коробкова Е.А., Кузьмин В.А., Лунегов А.М.* Ветеринарные препараты на основе наночастиц серебра, модифицированных мирамистином: новые возможности в лечении кошек и собак. — *Международный вестник ветеринарии*, 2015, **3**, 24.
212. *Коробкова Е.А., Кузьмин В.А., Лунегов А.М., Савенков К.С., Виолин Б.В., Загоруйко Е.Н., Жеребин П.М., Денисов А.Н., Лисичкин Г.В., Крутяков Ю.А.* Ветеринарные препараты на основе наночастиц серебра, модифицированных мирамистином: новые возможности в лечении кошек с ринитом, конъюнктивитом, гингивитом раз-

- личной этиологии. — Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии, 2015, 3, 153.
213. *Коптев В.Ю., Леонова М.А., Балыбина Н.Ю., Виолин Б.В., Кудринский А.А., Крутяков Ю.А.* Влияние препарата Аргумистин на приросты и уровень бактериальной контаминации организма бройлеров. — Птицеводство, 2015, 5, 31.
214. *Кузьмин В.А., Лунегов А.М., Крутяков Ю.А., Белкина И.В., Савенков К.С.* Изучение антибактериальной и антимикотической активности препарата Аргумистин. — Международный вестник ветеринарии, 2015, 2, 36.
215. *Симонов П.Г., Малышев А.А., Кудринский А.А., Федотов С.В.* Сравнительная эффективность ветеринарных препаратов для лечения гнойно-катарального эндометрита у высокопродуктивных молочных коров черно-пестрой породы. — Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2014, 8, 94.
216. *Казаринов Н.П., Донченко Н.А., Богданова М.С., Виолин Б.В., Коробкова Е.А., Денисов А.Н., Крутяков Ю.А.* Изучение хронической гепатотоксичности препарата Аргумистин<sup>®</sup> при энтеральном способе введения. — Аграрная наука, 2015, 3, 25.
217. *Казаринов Н.П., Донченко Н.А., Богданова М.С., Виолин Б.В., Коробкова Е.А., Денисов А.Н., Крутяков Ю.А.* Изучение хронической энтеротоксичности антибактериального препарата Аргумистин<sup>®</sup> при энтеральном введении. — Аграрная наука, 2015, 2, 21.
218. *Крутяков Ю.А., Климов А.И., Коробкова Е.А., Лунегов А.М., Кузьмин В.А.* Лечение кошек с конъюнктивитом и гингивитом ветеринарной лекарственной композицией на основе наночастиц серебра. — Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии, 2015, 4, 106.
219. *Скриплева Т.А., Кузьмин В.А., Лунегов А.М., Забровская А.В., Крутяков Ю.А.* Применение ветеринарного препарата на основе наночастиц серебра для лечения телят с желудочно-кишечными болезнями. — Международный вестник ветеринарии, 2015, 3, 43.
220. *Крутяков Ю.А., Симонов П.Г., Хаперский Ю.А., Виолин Б.В., Федотов С.В.* Эффективность нового антибактериального препарата Аргумистин при хроническом эндометрите коров. — Ветеринария, 2015, 10, 42.
221. *Боляхина С.А., Насартдинова Г.Ф., Донченко Н.А., Коробкова Е.А., Денисов А.Н., Крутяков Ю.А.* Исследование острой и хронической токсичности препарата Аргумистин. — Сибирский вестник сельскохозяйственной науки, 2014, 3, 95.
222. *Коптев В.Ю., Титова М.А., Балыбина Н.Ю., Коробкова Е.А., Кудринский А.А., Денисов А.Н., Крутяков Ю.А.* Оценка уровня накопления серебра в тканях и органах цыплят-бройлеров при пероральном и аэрозольном применении коллоидного серебра. — Проблемы биологии продуктивных животных, 2014, 3, 92.
223. *Кузьмин В.А., Лунегов А.М., Кудрявцева А.В., Савенков К.С., Крутяков Ю.А.* Терапевтическая эффективность комплексных препаратов на основе наносеребра. Иппология и ветеринария, 2014, 3, 13, 61.
224. *Ma C., White J.C., Zhao J., Zhao Q., Xing B.* Uptake of engineered nanoparticles by food crops: characterization, mechanisms, and implications. — Annual review of food science and technology, 2018, 9, 129.
225. *Cornelis G., Hund-Rinke K., Kuhlbusch T., van den Brink N., Nickel C.* Fate and bioavailability of engineered nanoparticles in soils: a review. — Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2014, 44(24), 2720.
226. *Anjum N.A., Gill S.S., Duarte A.C., Pereira E., Ahmad I.* Silver nanoparticles in soil-plant systems. — Journal of Nanoparticle Research, 2013, 15(9), 5083.
227. *Bae S., Hwang Y.S., Lee Y.-J., Lee S.-K.* Effects of water chemistry on aggregation and soil adsorption of silver nanoparticles. — Environmental health and toxicology, 2013, 28, e2013006.

228. Liang Y., Bradford S.A., Simunek J., Heggen M., Vereecken H., Klumpp E. Retention and remobilization of stabilized silver nanoparticles in an undisturbed loamy sand soil. — *Environmental science & technology*, 2013, **47**(21), 12229.
229. Whitley A.R., Levard C., Oostveen E., Bertsch P.M., Matocha C.J., von der Kammer F., Unrine J.M. Behavior of Ag nanoparticles in soil: effects of particle surface coating, aging and sewage sludge amendment. — *Environmental pollution*, 2013, **182**, 141.
230. Cornelis G., Pang L., Doolette C., Kirby J.K., McLaughlin M.J. Transport of silver nanoparticles in saturated columns of natural soils. — *The Science of the total environment*, 2013, **463-464**, 120.
231. Bell R.A., Kramer J.R. Structural chemistry and geochemistry of silver-sulfur compounds: critical review. — *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999, **18**(1), 9.
232. Salama H.M.H. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). — *International Research Journal of Biotechnology*, 2012, **3**(10), 190.
233. Yin L., Cheng Y., Espinasse B., Colman B.P., Auffan M., Wiesner M., Rose J., Liu J., Bernhardt E.S. More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. — *Environmental science & technology*, 2011, **45**(6), 2360.
234. Jiang H.-S., Li M., Chang F.-Y., Li W., Yin L.-Y. Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO<sub>3</sub> toxicity to *Spirodela polyrhiza*. — *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, **31**(8), 1880.
235. Cvjetko P., Zovko M., Štefani P.P., Biba R., Tkalec M., Domijan A.-M., Vrek I.V., Letofsky-Papst I., Šiki S., Balen B. Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. — *Environmental science and pollution research international*, 2018, **25**(6), 5590.
236. Quah B., Musante C., White J.C., Ma X. Phytotoxicity, uptake, and accumulation of silver with different particle sizes and chemical forms. — *Journal of Nanoparticle Research*, 2015, **17**(6), 1471.
237. Пашкевич Е.Б., Верховцева Н.В., Горшкова К.В., Крутяков Ю.А., Жеребин П.М. Изменение элементного состава в вегетативных органах роз и торфогрунтах после фоллиарной обработки наносеребром в условиях защищенного грунта. — *Проблемы агрохимии и экологии*, 2017, **4**, 9.
238. Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. — *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 1999, **50**, 601.
239. Ho C.-M., Wong C.-K., Yau S.K.-W., Lok C.-N., Che C.-M. Oxidative dissolution of silver nanoparticles by dioxygen: a kinetic and mechanistic study. — *Chemistry, an Asian journal*, 2011, **6**(9), 2506.
240. Ho C.-M., Yau S.K.-W., Lok C.-N., So M.-H., Che C.-M. Oxidative dissolution of silver nanoparticles by biologically relevant oxidants: a kinetic and mechanistic study. — *Chemistry, an Asian journal*, 2010, **5**(2), 285.
241. Gondikas A.P., Morris A., Reinsch B.C., Marinakos S.M., Lowry G.V., Hsu-Kim H. Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation. — *Environmental science & technology*, 2012, **46**(13), 7037.
242. Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. — Петрозаводск: Институт биологии Карельского НЦ РАН, 2007. — 172 с.
243. Серегин И.В. Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений. — *Успехи биологической химии*, 2001, **41**, 283.

244. Metal ions in life sciences, Volume 5, Metallothioneins and Related Chelators / Edited by A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel. — Cambridge: The Royal Society of Chemistry (RSC), 2009. — 536 p.
245. *Ortiz D.F., Ruscitti T., McCue K.F., Ow D.M.* Transport of metal binding peptides by HMT-1, a fission yeast ABC type vacuolar membrane protein. — *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**, 4721.
246. *Salt D.E., Rauser W.E.* MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. — *Plant Physiology*, 1995, **107**(4), 1293.
247. *Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H.* Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. — *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, **84**, 439.
248. *Grill E., Löffler S., Winnacker E.-L., Zenk M.H.* Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). — *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, **86**(18), 6838.
249. *Chen J., Zhou J., Goldsbrough P.B.* Characterization of phytochelatin synthase from tomato. — *Physiologia Plantarum*, 1997, **101**(1), 165.
250. *Gardea-Torresdey J.L., Gomez E., Peralta-Videa J.R., Parsons J.G., Troiani H., Jose-Yacamán M.* Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. — *Langmuir*, 2003, **19**(4), 1357.
251. *Harris A.T., Bali R.* On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. — *Journal of Nanoparticle Research*, 2008, **10**(4), 691.
252. *Haverkamp R.G., Marshall A.T.* The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: limits on accumulation. — *Journal of Nanoparticle Research*, 2009, **11**(6), 1453.
253. *Krutyakov Y.A., Kudrinskiy A.A., Olenin A.Y., Lisichkin G.V.* Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. — *Russian Chemical Reviews*, 2008, **77**(3), 233.
254. Interlaboratory root elongation testing of toxic substances on selected plant species / Edited by H.C. Ratsch. — Corvallis: US Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, 1983, EPA-600/S3-83-051.
255. *Cox A., Venkatachalam P., Sahi S., Sharma N.* Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: a review of current research. — *Plant physiology and biochemistry*, 2016, **107**, 147.
256. *Gruyer N., Dorais M., Bastien C., Dassylva N., Triffault-Bouchet G.* Interaction between silver nanoparticles and plant growth. — *Acta Horticulturae*, 2014, **1037**, 795.
257. *Beyer E.M.* A potent inhibitor of ethylene action in plants. — *Plant Physiology*, 1976, **58**(3), 268.
258. *Beyer E.M.* Silver ion: a potent anti-ethylene agent in cucumber and tomato. — *Hort Science*, 1976, **11**(3), 175.
259. *Geisler-Lee J., Wang Q., Yao Y., Zhang W., Geisler M., Li K., Huang Y., Chen Y., Kolmakov A., Ma X.* Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. — *Nanotoxicology*, 2013, **7**(3), 323.
260. *Schaller G.E., Binder B.M.* Inhibitors of ethylene biosynthesis and signaling. — *Methods in molecular biology*, 2017, **1573**, 223.
261. *Sisler E.C., Serek M.* Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. — *Physiologia Plantarum*, 1997, **100**(3), 577.
262. *Rodriguez F.I., Esch J.J., Hall A.E., Binder B.M., Schaller G.E., Bleecker A.B.* A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. — *Plant Physiology*, 1999, **283**(5404), 996.

263. Ichimura K., Shimizu H., Hiraya T., Hisamatsu T. Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on the vase life of cut carnation, *Delphinium* and sweet pea flowers. — Bulletin of National Institute of Floricultural Science, 2002, 2, 1.
264. Mohiuddin A.K.M., Chowdhury M.K.U., Abdullah Z.C., Napis S. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. — Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997, 51(1), 75.
265. Strader L.C., Beisner E.R., Bartel B. Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene response. — The Plant cell, 2009, 21(11), 3585.
266. Kumar V., Parvatam G., Ravishankar G.A. AgNO<sub>3</sub> — a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. — Electronic Journal of Biotechnology, 2009, 12(2), 0.
267. Serek M., Sisler E.C., Mibus H. Chemical compounds interacting with the ethylene receptor in ornamental crops. — Acta Horticulturae, 2015(1060), 23.
268. Zhao X.-C., Qu X., Mathews D.E., Schaller G.E. Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. — Plant Physiology, 2002, 130(4), 1983.
269. McDaniel B.K., Binder B.M. Ethylene receptor 1 (*etr1*) is sufficient and has the predominant role in mediating inhibition of ethylene responses by silver in *Arabidopsis thaliana*. — Journal of biological chemistry, 2012, 287(31), 26094.
270. Noctor G., Arisi A.-C.M., Jouanin L., Kunert K.J., Rennenberg H., Foyer C.H. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. — Journal of Experimental Botany, 1998, 49(321), 623.
271. Montillet J.-L., Cacas J.-L., Garnier L., Montané M.-H., Douki T., Bessoule J.-J., Polkowska-Kowalczyk L., Maciejewska U., Agnel J.-P., Vial A., Triantaphylidès C. The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses. — American Journal of Plant Sciences, 2004, 40(3), 439.
272. Stone J.R., Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. — Antioxidants & redox signaling, 2006, 8(3-4), 243.
273. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам. — Успехи современной биологии, 2006, 126, 250.
274. Savithamma N., Ankanna S., Bhumi G. Effect of nanoparticles on seed germination and seedling growth of *Boswellia ovalifoliolata* — an endemic and endangered medicinal tree taxon. — Nano Vision, 2012, 2(1, 2, 3), 61.
275. An J., Zhang M., Wang S., Tang J. Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP. — LWT Food Science and Technology, 2008, 41(6), 1100.
276. Syu Y.-Y., Hung J.-H., Chen J.-C., Chuang H.-W. Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. — Plant physiology and biochemistry, 2014, 83, 57.
277. Sharma P., Bhatt D., Zaidi M.G.H., Saradhi P.P., Khanna P.K., Arora S. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. — Applied biochemistry and biotechnology, 2012, 167(8), 2225.
278. Abd-Alla M.H., Nafady N.A., Khalaf D.M. Assessment of silver nanoparticles contamination on faba bean — *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* — *Glomus aggregatum* symbiosis: Implications for induction of autophagy process in root nodule. — Agriculture, Ecosystems & Environment, 2016, 218, 163.
279. Zuerza-Mena N., Armendariz R., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: root growth reduction and modifications in the nutritional value. — Frontiers in plant science, 2016, 7, 90.

280. Song U., Jun H., Waldman B., Roh J., Kim Y., Yi J., Lee E.J. Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO<sub>2</sub> and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). — Ecotoxicology and environmental safety, 2013, **93**, 60.
281. Gubbins E.J., Batty L.C., Lead J.R. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*L. — Environmental pollution, 2011, **159**(6), 1551.
282. Musante C., White J.C. Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: differential effects of nano and bulk-size particles. — Environmental toxicology, 2012, **27**(9), 510.
283. Шаповал О.А., Мухина М.Т., Климов А.И., Кудринский А.А., Крутяков Ю.А. Влияние коллоидного серебра на рост, развитие растений и урожайность сои. — Аграрная наука, 2015, **12**, 12.
284. Шаповал О.А., Можарова И.П., Крутяков Ю.А. Зеребра агро – регулятор роста нового поколения. — Защита и карантин растений, 2017, **6**, 35.
285. Шаповал О.А., Можарова И.П., Барчукова А.Я., Коршунов А.А., Мухина М.Т., Лазарева А.С., Грабовская Т.Ю., Крутяков Ю.А., Корсункина Н.П., Вакуленко В.В. Регуляторы роста растений в агротехнологиях основных сельскохозяйственных культур. — М.: ВНИИА, 2015. — 348 с.
286. Denisov A.N., Krutyakov Y.A., Kudrinskiy A.A. Stimulant and method for stimulating plant growth and development. — Patent of People's Republic of China, 2017, ZL201280076486.6.
287. Zakharova O., Gusev A., Skripnikova E., Skripnikova M., Krutyakov Y., Kudrinsky A., Mikhailov I., Senatova S., Chuprunov C., Kuznetsov D. Study of ecologo-biological reactions of common flax to finely dispersed metallurgical wastes. — IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2015, **98**, 12018.
288. Гусев А.А., Ажимова О.А., Крутяков Ю.А., Климов А.И., Денисов А.Н., Кузнецов Д.В., Годымчук А.Ю., Ихалайнен Е.С. Влияние высокодисперсных частиц различной природы на ранние стадии онтогенеза растений рапса (*Brassica napus*). — Науковедение, 2013, **5**, 1.

## Глава 9

# Наноразмерные системы для контролируемой доставки лекарственных веществ

*Бычкова А.В.<sup>1</sup>, Ольхов А.А.<sup>2</sup>, Карпова С.Г.<sup>1</sup>, Иорданский А.Л.<sup>2</sup>*

Современная парадигма адресного транспорта лекарственных веществ (ЛВ) к органу и клетке-мишени основана на использовании биосовместимых носителей, размеры которых находятся в субмикронном и нанодиапазонах. Сегодня функциональные носители биологически активных соединений и абсорбенты с высокой удельной поверхностью находят широкое применение в биомедицине в виде биокерамических материалов, полимерных терапевтических систем, каркасных структур для клеточной инженерии, наноразмерных гибридных средств направленного транспорта ЛВ и еще ряда инновационных систем, одновременно выполняющих функции имплантатов и носителей биологически активных соединений [1–5]. Среди указанных функциональных материалов наибольшие практические и коммерческие преимущества, в ближайшем будущем, получают гибридные микро- и наночастицы [6, 7], а также композиционные ультратонкие волокна [8, 9], обладающие высокой удельной поверхностью, структурным разнообразием и способностью эффективно контролировать доставку ЛВ.

Микро- и наночастицы на основе биоразлагаемых материалов имеют широкий спектр применений в качестве компонентов инновационных форм или самостоятельных систем для транспорта ЛВ при реализации противовоспалительной, противоопухолевой и тромболитической терапии, а также при ранозаживляющих процедурах. Использование магнитных наночастиц в составе инновационных систем может способствовать направленному транспорту ЛВ к биологической цели, снижая необходимую дозу лекарственного препарата, обеспечивать пролонгирующее действие активности биологических макромолекул, например ферментов, и возможность визуализации процессов доставки ЛВ [10–12].

Использование биodeградируемых и биосовместимых частиц и волокон создает дополнительные преимущества при разработке нового поколения терапевтических систем, имплантируемых в живой организм. Поэтому сегодня основная часть работ, направленных на разработку биоразлагаемых

<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, РАН

<sup>2</sup> Институт химической физики им. Н.Н. Семенова, РАН



композиций в медицине, посвящена созданию материалов для тканевой инженерии. Современные металлические импланты (титан и его сплавы, нержавеющая сталь и др.) характеризуются жесткостью и выносливостью, не вызывают иммунного ответа, однако не обладают свойствами остеоиндуктивности и остеокондуктивности. Зачастую при их использовании оказывается необходимым повторное хирургическое вмешательство для извлечения импланта, связанное с дополнительными рисками и увеличением продолжительности процесса восстановления пациента, а также терапия, направленная на восстановление костной ткани и ее окружения. Современные фундаментальные и прикладные исследования рассматривают в качестве объектов неорганические материалы-аналоги костной ткани, такие как апатит и сложные композиционные биоразлагаемые формы, которые обеспечивают транспорт биологических молекул и синтетических ЛВ.

Одним из инновационных способов получения ультратонких волокон и фибриллярных наноматериалов является метод электроформования (ЭФ) полимерных растворов и расплавов [13, 14]. Развитие технологии формирования паповолокон в электростатическом поле позволяет создавать разнообразные по форме и морфологии материалы с высокой удельной поверхностью и пористостью, с адекватными механическими свойствами и широким диапазоном структурно-динамических и диффузионных характеристик. Фибриллярные матрицы и маты, образованные полученными нановолокнами, создают благоприятные условия для свободной миграции и пролиферации клеток в трехмерном пространстве каркасных структур и, соответственно, обеспечивают высокое интеграционное сродство материала к живым тканям организма [15]. Они активно используются при конструировании биосенсоров, наночистот, для раневой терапии, с целью иммобилизации ферментов, при создании пролонгированных и адресных средств доставки ЛВ и в других областях современной биологии и медицины [16–20].

Следует отметить, что в отличие от большого числа публикаций по проблеме применения наночастиц различной природы, разработке биодеградируемых и биорезорбируемых фибриллярных наноматериалов посвящено не слишком большое число современных исследований, см., например, [21–23]. Примерно треть публикаций анализирует особенности технологии получения волокон методом ЭФ, а оставшаяся часть рассматривает их характеристики, функциональное поведение *in vitro* и *in vivo*, а также доклинические и клинические испытания. В данной главе будет представлен краткий обзор современного состояния наноразмерных частиц, относящихся к классу биоразлагаемых носителей лекарственных соединений, а затем проиллюстрированы наиболее значимые характеристики ультратонких волокон, полученных инновационным методом электрофор-

мования. С учетом предыдущих исследований, здесь будут рассмотрены специфические свойства нановолокнистых биоразлагаемых носителей ЛВ как на структурном, так и на диффузионно-кинетическом уровнях. Такой подход является принципиально важным при создании нового поколения терапевтических систем для дозированного и направленного транспорта ЛВ в живых системах.

## 9.1. Области применения биоразлагаемых форм доставки соединений терапевтического назначения

В настоящее время основная часть работ по применению биоразлагаемых композиций в медицине посвящена созданию материалов для тканевой инженерии (рис. 9.1). Современные металлические импланты (титан и его сплавы, нержавеющая сталь и др.) характеризуются жесткостью и длительной работоспособностью, не вызывают иммунного ответа, однако не обладают свойствами остеоиндуктивности и остеокондуктивности. Зачастую при использовании имплантов оказывается необходимой терапия, направленная на восстановление костной ткани и ее окружения, а также повторное хирургическое вмешательство для извлечения импланта. Последнее связано с дополнительными рисками и увеличением продолжительности процесса восстановления пациента. Вследствие этого возникает потребность в разработке инновационных материалов-аналогов костной ткани и сложных композиционных биоразлагаемых форм, обладающих рядом достоинств современных имплантов и способностью транспортировать биологические молекулы и синтетические ЛВ.

Биологический апатит — основной минеральный компонент натуральной кости (~69%). Биологический апатит является природным представителем кальций-фосфатных материалов (СаР), к которым относятся гидроксипатит и фосфаты кальция. Эти материалы служат основой для создания двухмерных форм — покрытий — и трехмерных форм — кальций-фосфатного цемента и каркасных структур. Материалы из СаР характеризуются различными соотношениями кальция и фосфора. Самое низкое соотношение (0,5) соответствует моногидрату однозамещенного фосфата кальция.



**Рис. 9.1.** Основные области применения инновационных форм на основе биоразлагаемых макромолекул для доставки низко- и высокомолекулярных ЛВ

Способность СаР быть платформами для роста новой костной ткани (свойство остеокондуктивности) также обеспечивается группой органических молекул — белков (например, протеогликанов), липидов, остеогенных факторов (факторов роста костной ткани и эндотелия). Известно, что органическая матрица кости (~22%) состоит из коллагена I типа (90% матрицы), синепротейна кости, остеопектина и остеопоптина, хондроитин сульфата и кератансульфата, остеокальцина, бигликана и декорина, тромбоспондина и фибронектина [24]. Сочетание СаР с факторами роста, специальными биологически активными белками или остеогенными лекарственными веществами обеспечивает остеоиндуктивность материалов — саморегенерацию костной ткани.

Продуктами деградации СаР являются ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{PO}_4^{-3}$ , которые представлены в организме и кровотоке. Таким образом, СаР не вызывает иммунного ответа и, в отличие от биоразлагаемых макромолекулярных материалов, не подвергается ферментативному расщеплению с образованием побочных продуктов деградации. Эти качества и стимул-чувствительная способность к растворению (при кислых pH, имеющих место в эндочитарных везикулах, лизосомах и вблизи твердых опухолей) делают СаР подходящими материалами для доставки лекарственных веществ [24].

Наночастицы на основе СаР могут быть получены путем преципитации, золь-гель синтеза, гидротермального синтеза, распылительной сушки, с применением мицелл и обратных мицелл, а также двойных эмульсий. ЛВ не вступают в контакт с продуктами разложения частиц СаР, что является еще одним достоинством использования этого биоразлагаемого материала. Задача предотвращения преждевременного высвобождения ЛВ, которая возникает, например, при трансфекции, когда гены попадают в лизосому до попадания в ядро клетки, может быть решена созданием

многослойных покрытий. Так, например, в работе [25] ядро СаР покрывают молекулами ДНК, на которые, в свою очередь, наносят новый слой СаР и затем дополнительный слой ДНК. Использование второго или третьего слоя обеспечивает защиту от внешних и внутренних процессов деградации, которые могут негативно сказаться на транспорте ЛВ. Особенности высвобождения ЛВ из материалов на основе СаР предопределены также растворимостью и химической природой конкретного ЛВ.

Взаимодействие между ЛВ и структурированным трехмерным материалом (например, СаР цементом) влияет на биоразложение материала в процессе его практического использования. Различные профили высвобождения ЛВ при использовании природных и синтетических полимерных материалов в качестве компонентов биоразлагаемых матриц или покрытий на СаР реализуются за счет изменения химического состава материалов, пористости материала, площади поверхности частиц, заряда их поверхности и кристалличности, путем изменения природы и морфологии полимеров в результате модификации их химической структуры и введения ковалентных сшивок.

Природные и синтетические полимерные материалы могут использоваться в качестве покрытий, самостоятельных структур (трехмерных пористых или волоконных матриц), предназначенных для тканевой инженерии, а также микро- и наноразмерных включений в эти структуры или отдельных частиц для транспорта ЛВ. Представители перечисленных материалов будут рассмотрены в этом и последующем разделах. Достаточно часто они имеют форму гидрогелей. Загрузка носителей терапевтическими препаратами (низкомолекулярными ЛВ, факторами роста, другими функционально значимыми макромолекулами, клетками) может осуществляться на различных стадиях получения терапевтических систем, и одновременно с процессами эрозии, деградации или набухания полимера режим загрузки часто определяет профиль высвобождения ЛВ.

Включение нагруженных препаратом микро- и наноразмерных систем в гидрогели или пористые каркасные структуры способствует доставке одного или нескольких ЛВ с различной активностью (например, факторов роста и противовоспалительных лекарств) к биологической мишени, снижая общий необходимый уровень введения ЛВ в организм. Композиционные материалы при этом сочетают достоинства своих компонентов и могут оказаться привлекательными для клипического использования. Частицы с размерами от 50 до 700 нм для транспорта ЛВ могут проникать через стенки капилляров в клетки и обеспечивать регенерацию тканей [26]. Гидрогели из природных полисахаридов обладают высоким сходством с внеклеточным матриксом тканей, в состав которого входят различные глюкозаминогликаны.

Примером медицинской задачи, решение которой требует высокотехнологичных подходов к доставке ЛВ, является остеомиелит. Для лечения этого заболевания при различном его течении оказываются необходимыми курсы антибиотиков, в том числе, применяемых перорально (ципрофлоксацина, моксифлоксацина, левофлоксацина, клиндамицина, метронидазола, фосфомицина и триметоприм/сульфаметоксазола), отличающиеся высокой системной токсичностью и стоимостью, или внутривенное введение лекарств (ванкомицина, дактиномицина и тейкопланина), демонстрирующих сниженное проникновение в ткань [27]. Очевидно, что использование композиционных форм может стать основой более эффективной стратегии терапии остеомиелита вследствие доставки ЛВ требуемой концентрации к мишени и снижения его концентрации до минимального уровня в нецелевых областях. При этом авторы [26] указывают, что доставка лекарств для терапии остеомиелита с помощью биоразлагаемых композиций, включающих коллаген, желатин или синтетические полимеры, такие как полимолочная кислота (PLA), полигликолевая кислота (PGA) а также поликапролактон (PCL), их сополимеры (например, PLGA) или производные с полиэтиленгликолем (PEG), может обеспечивать более эффективный выход ЛВ, чем инертные частицы (например, из полиметилметакрилата (PMMA)).

Биоразлагаемые композиции также находят применение при решении задачи ранозаживления, которая может включать комплекс подзадач — остановку кровотечения, предотвращение воспалительных процессов, пролиферацию и реконструкцию ткани. Для хронических ран свойственны высокая протеазная активность, инфицирование, воспаление, гипоксия. В настоящее время разрабатывается широкий круг материалов, предназначенных для заживления ран. Это ненаполненные материалы на основе силиксисилоксана, декстрана, уретана, коллагена и др.; материалы, включающие стволовые клетки или витамин E, на основе гиалуроновой кислоты; материалы на основе белков внеклеточного матрикса (фибрина, фибронектина, коллагена и др.) для реконструкции тканей и ангиогенеза; материалы, включающие антибиотики и другие ЛВ [28]. Уже получили клиническое применение материалы в виде пленок, гидрогелей, пен, многослойных композиций и др.

Известный своей гемостатической и антибактериальной активностью хитозан используется в ряде разрабатываемых в настоящее время композиционных форм для ускоренного заживления ран и доставки ЛВ с целью формирования матрикса и реконструирования ткани. В работе [29] химически стабильные композиционные материалы для раневых повязок созданы на основе двух полисахаридов — целлюлозы и хитозана, и сочетают в себе механическую прочность (свойства целлюлозы) и способности

к остановке кровотечения, очищению и заживлению ран, доставке ЛВ и бактерицидные свойства (свойства хитозана).

Регенерация хрящевой ткани напрямую связана с числом хондроцитов на единицу ее массы и введение в поврежденные участки взвеси хондроцитов считается в настоящее время перспективным терапевтическим подходом. Чужеродные хондроциты, будучи введенными в полость сустава, не вызывают реакции отторжения, т. к. обладают ограниченной иммуногенной активностью. Разработке композиционных гидрогелей для инъекций сейчас уделяется большое внимание — проводятся исследования с использованием фотополимеризации, химического сшивания молекул в составе композита карбодимидом, глутаровым альдегидом, генипином и дигидразидом адипида. В первом случае требуется использование фотосенсибилизатора и облучения, ограничивающее применимость подхода, а в случае сшивателей основной проблемой является их токсичность по отношению к клеткам. В работе [30] новый представитель композиционных гидрогелей получен на основе хитозана и окисленной гиалуроновой кислоты. Образование геля проходило через реакцию образования основания Шиффа между amino- и альдегидными группами производных полисахаридов — *N*-сукцинил-хитозана (S-CS) и альдегидагиалуроновой кислоты — и не предполагало использования химического сшивающего агента. Потенциал применения каркасных УНТ-композиционных гидрогелей в качестве каркасных структур для инъекций был показан на примере клеток хрящевой ткани суставов. В проведенном исследовании высокое содержание хитозана приводило к снижению скорости деградации композита.

Рассмотрим несколько примеров применения композиционных частиц на основе биоразлагаемых полимеров. В работе [31] гидрогели на основе хитозана и желатина используются для длительного введения антиглаукомного ЛВ тимолола малеата и позволяют снизить побочные эффекты его применения. Гидрогели на основе сульфированного хитозана и гепаринподобного хитозана (содержащего карбоксиметильные и сульфатные группы) способствуют увеличению времени свертывания крови [32], предотвращению адсорбции белка и тромбоцитов на мембране, предназначенной для очистки крови [33] и предотвращения активации комплемента [34].

Гидрогели, состоящие из хитозана, гепарина и поли( $\gamma$ -глутаминовой кислоты) с различными соотношениями компонентов и нагруженные супероксиддисмутазой, использовали для создания рапевой повязки с антиоксидантными свойствами [35]. Такая повязка обладала потенциалом терапии состояния хронической травмы при диабете и показала себя перспективным средством ранозаживления. Гепарин-нагруженный гидрогель на основе фоточувствительного гидроксипропилхитозана способствовал продолжительному эффекту понижения внутриглазного давления после опе-

рации по устранению глаукомы [36]. Тогда как возможности транспорта антикоагулянта гепарина в качестве составного элемента частиц активно исследуются, значительно меньшее количество работ посвящено транспорту белков, связанных с функционированием систем фибринолитической и противосвертывающих систем — тканевого активатора плазминогена (tPA), стрептокиназы и урокиназы.

Образование комплексов между ферментами и биodeградируемыми полимерами показало себя эффективным способом преодоления короткого биологического периода полужизни ферментов в кровотоке, а включение в состав частиц магнитных ядер раскрыло потенциал применения биоразлагаемых материалов для нацеленного транспорта ЛВ и диагностики. Магнитные ядра и доставляемые на их оболочке (например, состава PEG/хитозан [37]) tPA или стрептокиназа способствуют тромболизису, управляемому внешним магнитным полем. В работе [38] хитозан и PLGA на магнитном ядре, связанные с tPA, обеспечивали узнавание частиц раковыми клетками поджелудочной железы, имеющими рецепторы к tPA (последний выступал, таким образом, в роли биовектора). Гидрогели на основе хитозана и альгината с включенными магнитными частицами были исследованы в качестве носителей противоракового препарата матрикса для перорального его введения [39]. Полученные системы демонстрировали возможности pH-чувствительного высвобождения и нацеливания под действием слабых магнитных полей. Включение магнитных частиц в системы на основе гиалуроновой кислоты в работе [40] осуществлялось для детекции процессов регенерации тканей и биологической доставки ЛВ с участием систем.

Области возможного применения биоразлагаемых форм не ограничиваются приведенными выше примерами. Новые конструкции кардиостентов с биodeградируемыми или инертными покрытиями способны обеспечивать направленный транспорт кардиологических препаратов (паклитаксель, сиролimus, такролимус и т. п.), ответственных за подавление пролиферации клеток, поэтому их пролонгированная доставка существенно снижает число инцидентов рестеноза по сравнению с пружинными металлическими стентами первого поколения. Кроме того, желательной оказывается наноструктурированная поверхность стентов для регулируемой клеточной адгезии. В урологии отдельную группу полимерных имплантатов составляют представители природных биodeградируемых полимеров — поли- $\alpha$ -оксикислоты (полилактиды и их сополимеры) и поли- $\beta$ -оксиалканоаты (полигидроксибутират (ПГБ), его сополимеры с оксивалератом, оксигексаноатом и т. п.), а основой для нейрологических имплантатов являются биodeградируемые полимеры типа полилактидов или полиоксиалканоатов [41]. При этом в урологии в основном требуется пролонгированное

высвобождение бактерицидных препаратов, а в области регенерации нервных тканей — ЛВ, активирующего развитие нервного импульса.

Современные работы включают также создание систем с обратным ответом, примером которых может быть форма, выделяющая инсулин в зависимости от концентрации глюкозы в крови [42]. Возможность визуализации области развития патологического процесса и контроля протекания процесса лечения представляется при использовании изотопов, флуоресцентных красителей, квантовых точек, магнитных наночастиц и других маркеров [43].

Биоразлагаемые инновационные материалы, таким образом, получили широкий спектр возможного применения при терапии различных заболеваний (рис. 1) в виде различных медицинских форм — макрообъектов, пленок, микро- и наночастиц и др. Большое разнообразие требуемых составов и морфологии матриц медицинских форм способствует возникновению фундаментальных и прикладных вопросов, сопряженных с применением природных и синтетических материалов для доставки низко- и высокомолекулярных биологически активных веществ (БАВ). Подробнее о возможном химическом составе матриц для транспорта ЛВ и способах включения ЛВ в матрицу будет представлено в следующем разделе.

## 9.2. Основные компоненты биоразлагаемых инновационных форм доставки ЛВ

Рассмотрим основные компоненты биоразлагаемых материалов-составляющих инновационных форм на примере наиболее часто используемых для целей регенерации костевой ткани [26] коллагена, гиалуроновой кислоты, карбоксиметил целлюлозы (КМЦ), хитозана и других природных и синтетических макромолекул, структурные формулы которых изображены на рис. 9.2.

Хитозан представляет собой полисахарид из d-глюкозамина и N-ацетил-d-глюкозамина, связанный  $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями. Хитозан получают отщеплением от хитина ацетильной группировки. Реакция деацетилирования может также сопровождаться разрывом гликозидных связей полимера. Степень деацетилирования хитозана и его молекулярная масса определяют его реакционную способность и свойства, обусловленные структурной неоднородностью макромолекул. Растворимость хитозана зависит от pH (он не растворим при нейтральных значениях), а его соли, например гидрохлорид хитозана и хитозан-глутамат, растворимы при любых pH. Гидрофильность хитозана и его положительный заряд способствуют проведению его реакций с отрицательно заряженными мак-



ромолекулами и полианионами, являющимися как компонентами матрицы биоразлагаемого композита, так и функциональными молекулами. Это делает возможным использование золь-гель процессов для связывания ЛВ. Положительный заряд хитозана способствует также адгезии на слизистых оболочках организма, что позволяет использовать его для транспорта ЛВ через слизистую. Таким образом, особенностями хитозана является pH-зависимая растворимость (при  $\text{pH} < 5$  и при основных pH) и незначительная токсичность за счет  $\text{NH}_2$  групп (он подвергается ферментативному расщеплению *in vivo*, а продукты его деградации вовлекаются в цикл метаболизма).

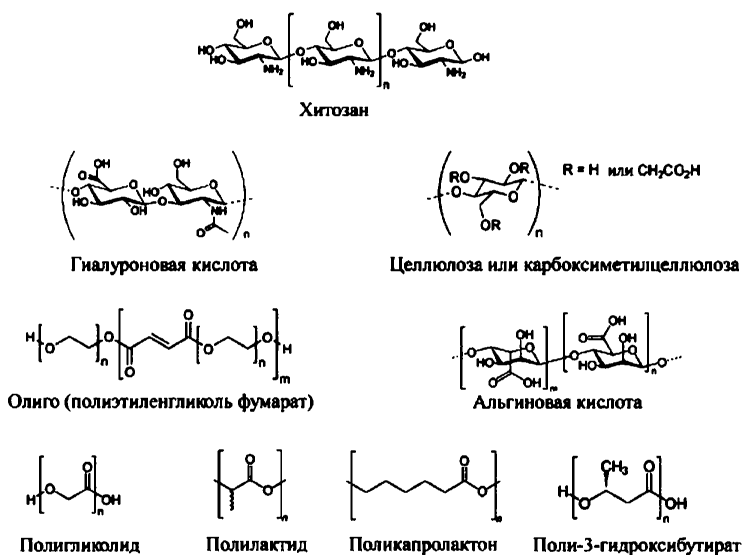


Рис. 9.2. Структурные формулы некоторых биоразлагаемых макромолекул, используемых для направленного транспорта низко- и высокомолекулярных ЛВ

КМЦ может использоваться вместе с целлюлозой и по своей структуре похожа на хитозан. Натриевая соль КМЦ является водорастворимым полимером. Целлюлоза представляет собой полисахарид с формулой  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ , в составе которого остатки D-глюкозы соединены  $\beta(1 \rightarrow 4)$ -гликозидными связями. Целлюлоза подвергается растворению под действием ионных жидкостей (органических солей, жидких при комнатной температуре). В работе [29] такой растворитель использован для получения композиционного материала для рапевых повязок на основе двух полисахаридов — целлюлозы и хитозана.

Коллаген и продукт его денатурации желатин имеют белковую природу и могут быть подвергнуты сшиванию, степень которого и используемые для сшивания агенты определяют механические свойства полученных материалов. В фибриллярной форме белки нерастворимы в воде. Наличие трипептида Arg-Gly-Asp (RGD) в структуре белков обеспечивает клеточное узнавание, важное для тканевой инженерии.

Другим примером молекул белков, которые могут являться компонентами микро- и наноразмерных каркасных структур, являются фибриноген и фибрин. Эти белки присутствуют в крови и являются основными участниками процесса ее свертывания, что обуславливает их высокие способности к взаимодействию с поврежденными тканями и клетками. Для решения задач, связанных с регенерацией тканей, белки могут быть модифицированы или введены в состав более сложных систем, включающих, например, факторы роста или другие белки, а также стволовые клетки [44]. Образование фибринового геля может быть инициировано непосредственно в месте повреждения с использованием частиц, на поверхности которых закреплен тромбин [45].

Основной белок шелка шелкопрядов фиброин и каркасный шелк паутины спидроин обладают кристаллическими частями, отвечающими за высокую прочность на разрыв, и аморфными частями, обеспечивающими эластичность, что делает их универсальными материалами для использования в тканевой инженерии, фармации, медицине независимо от вида конструкций. Продуктами распада фиброина шелка и спидроина являются аминокислоты, выступающие в качестве дополнительного строительного материала при регенерации ткани [46].

Гиалуроновая кислота – гидрофильный, неиммуногенный, биоразлагаемый глюкозаминогликан – полимер, состоящий из остатков D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюкозамина, соединенных поочередно  $\beta$ -1,4- и  $\beta$ -1,3-гликозидными связями, который в сочетании с другими остеокондуктивными молекулами способствует росту костной ткани. Она имеет высокое содержание во внеклеточных матриксах, является компонентом суставного хряща и входит в состав кожи. Амфифильные производные гиалуроновой кислоты способствуют ее самосборке в наногели типа «ядро/оболочка» для транспорта гидрофобных ЛВ, например, противораковых препаратов.

Для транспорта низко- и высокомолекулярных терапевтических веществ используются «депо-носители» на основе альгината натрия и его композиций с пектином, гиалуронатом натрия и др. Соли альгиновой кислоты (альгинаты), в отличие от самой кислоты-полисахарида, образуют коллоидные растворы в воде и обладают антимикробным и гемостатическим действием.

В отличие от природных макромолекул, синтетические биоразлагаемые молекулы не вызывают биологического ответа, не могут быть носителями болезней и широко распространены в качестве компонентов инновационных форм для доставки ЛВ. Примерами их могут быть поли- $\alpha$ -гидроксикислоты, например, гидрофобные полилактиды (PLA) и более гидрофильные полигликолиды (PGA), а также поли- $\beta$ -гидроксиалканоаты (ПГБ и его производные). Дegradaция полимеров протекает через гидролиз эфирных групп, а скорость и продукты деградации определяются составом, структурой и молекулярным весом молекул, а также содержанием в биологических жидкостях ионов и ферментов. Полимерные материалы класса поли- $\beta$ -гидроксиалканоатов или поли- $\alpha$ -оксикислот деструктурируют до нетоксичных продуктов —  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  [41]. К числу широко используемых алифатических полиэфиров относятся также поликапролактон (PCL). Смеси полимеров или сополимеры часто оказываются основой для материалов, предназначенных для восстановления костной и хрящевой ткани. Наиболее популярен сополимер полилактид-ко-гликолид (PLGA), соотношение компонентов которого влияет на гидрофильность и характеристики биоразложения. При сополимеризации снижается степень кристалличности, вследствие чего гидролитическая деструкция проходит быстрее [47].

В качестве других широко используемых синтетических макромолекул для регенерации костной ткани отмечают полипропиленфумарат (PPF), полиангидриды, полифосфазены [26]. Свойством биоразлагаемости, в отличие от PEG, обладает олиго (полиэтиленгликоль фумарат) (OPF) на его основе [48]. Дegradaция PPF и OPF обусловлена входящим в состав полимеров остатком фумариновой кислоты. Сополимеризация макромолекул, например полиангидридов, может быть осуществлена с целью повышения гидрофобности материалов и снижения скорости их биоразложения. Сочетание в композициях природных и синтетических материалов обеспечивает широкий спектр свойств систем и возможностей их использования. Примером природного материала, используемого для транспорта различных ЛВ в составе композиционных форм, является желатин [49].

В инновационных материалах одновременное использование природных и синтетических макромолекул создает уникальные возможности для доставки различных ЛВ и обеспечения требуемых профилей высвобождения. Как и в случае синтетических, при использовании природных гидрогелей химическое и физическое сшивание макромолекул позволяет регулировать диффузию включенных в биоразлагаемые формы терапевтических веществ, а биоразложение макромолекул определяется также степенью их сшивки и типом сшивающего агента. При этом сами лекарственные вещества могут быть ковалентно и нековалентно связаны с биоразлагаемыми композициями, в частности, включение ЛВ в состав частиц СаР

осуществляется физически или химически [24], причем высвобождение ЛВ может контролироваться химией CaP, пористостью материала, площадью поверхности частиц гидрогелей, зарядом их поверхности и кристалличностью. В случае ковалентной иммобилизации макромолекулярных ЛВ (например, белков) механизм высвобождения включает химическое/ферментативное отщепление действующего вещества. Введение антибиотика при терапии остеомиелита может быть обеспечено путем прямого смешивания порошка ЛВ с костным трансплантатом или вымачивания костного трансплантата в растворе антибиотика [26]. Аналогично для пролонгированной доставки стрептокиназы использовались системы, полученные смешением белка с хитозаном [50]. Урокиназа и стрептокиназа показали свою активность как тромболитиков на поверхности и в объеме частиц из хитозана и триполифосфата, обеспечивающих доставку, причем показатели в обоих случаях были выше, чем в растворе белков [51].

Введение ЛВ в композиционные структуры из раствора после их создания является одним из подходов, в наименьшей степени повреждающим ЛВ. Хондроциты в работе [30] вводили в гидрогель из раствора, в котором они были ресуспендированы. Другим примером методики, обеспечивающей минимальное влияние на структуру ЛВ, является подход с использованием состояния сверхкритической жидкости, обеспечивающий одностадийное заполнение пористых матриц лекарственными веществами.

Известны также подходы, включающие формирование специального комплекса ЛВ, например, с циклодекстринами, для его использования в золь-гель процессе, в ходе которого создаются биоразлагаемые композиционные структуры с инкорпорированным в них ЛВ [52]. ЛВ могут быть также адсорбированы на поверхности имплантируемых структур и покрыты биоразлагаемыми полимерными материалами с целью обеспечения их длительного высвобождения, что реализуется, например, в работе [25] при трансфекции. Гидрофобное ЛВ может быть инкапсулировано также в масляное ядро, покрытое биоразлагаемой оболочкой, которая включает, например, хитозан [53]. Высвобождение ЛВ можно разделить по типу на диффузионно контролируемое, контролируемое химическими процессами или разбуханием матрицы и контролируемое с помощью внешних процессов или устройств.

Большинство из перечисленных подходов включения ЛВ в различные матрицы может реализовываться и при включении в гидрогели nanoparticles. Частицы вводятся в состав композиций после образования геля и на стадии образования геля, с использованием или без использования процессов ковалентного связывания. Наночастицы в составе гидрогелей обеспечивают изменение их механических свойств и характеристики набухания,

а также способны придавать системам магнитные, оптические свойства, электропроводность и улучшенные противомикробные свойства [54].

В состав гибридных гидрогелей могут входить, например, наночастицы на основе углерода, неорганические частицы и наночастицы полупроводников, наночастицы металлов и их оксидов, полимеров и липосом. Так, например, в работе [55] введение наночастиц магнетита в гидрогель обеспечивается за счет их стабилизации олеиновой кислотой и амфифильной природы основного компонента гидрогеля — модифицированной гиалуроновой кислоты. Лиганды пирена способствуют формированию частиц гидрогеля со структурой «ядро/оболочка». Авторы [45] использовали магнитные частицы, связанные с тромбином, для формирования каркасных структур на основе фибрина. Твердые коллоидные наночастицы могут быть ядром для оболочки из полиэлектролитов, нанесенной с использованием послойных технологий адсорбции [55], а также входить в состав самой оболочки, обеспечивая магнитоуправляемость частиц. Так, например, авторы [56] модифицировали частицами маггемита полые микрокапсулы, полученные из сульфата декстрана и поли-L-лизина.

Таким образом, при создании инновационных форм для транспорта ЛВ используется большая группа биологических и синтетических макромолекул. Более развернутый обзор способов инкапсуляции ЛВ и составов биodeградируемых матриц не может быть представлен в рамках, ограниченного объема настоящей главы. Однако очевидно, что химический состав материалов в сочетании с особенностями созданных на их основе медицинских форм (в число которых входят размеры, пористость, наличие ковалентных сшивок, стимул-чувствительность) и способом инкапсуляции ЛВ определяют различную судьбу биodeградируемых материалов в биологических средах и различные профили высвобождения ЛВ.

### 9.3. Структура и морфология ультратонких волокон как носителей ЛВ

Структурная организация ультратонких волокон и их последующая сборка в виде ансамблей, матов, скаффолдов и композиционных матриц должна быть охарактеризована достаточно подробно. Такие характеристики волокон, как степень ориентации макромолекул, кристалличность, величина диаметра, геометрия поперечного сечения, пористость и другие, определяют не только механические свойства фибриллярных материалов, но и их функциональные характеристики, наиболее важными из которых являются скорость и механизм деградации макромолекул, сорбционная емкость ЛВ, его диффузия, а также механизм и продолжительность направленного

транспорта ЛВ, который зависит от вышеуказанных факторов. В последующих подразделах будет рассмотрено влияние структуры и морфологии волокон, полученных электроформованием, на их динамические характеристики, а именно на диффузию, сегментальную подвижность и профили контролируемого высвобождения модельного ЛВ.

### **Влияние концентрации порфиринового комплекса на геометрию волокна**

Среди биополимеров, применяющихся в стоматологии, травматологии, ортопедии, клеточной инженерии, хирургии наряду с полилактидами, одним из самых распространенных является поли-(3-гидроксibuтират) (ПГБ), основной представитель биополимеров семейства полигидроксиалканоатов [57]. Этот биополимер, синтезируемый микроорганизмами, обладает высокой биосовместимостью, способностью к быстрой биорезорбции без образования токсичных продуктов и повышенной стойкостью к окислительной деструкции [58, 59].

В ряде предыдущих работ было рассмотрено структурообразование фибриллярных материалов на основе ПГБ, содержащих дипиридамомол [60], хитозан [61], наночастицы диоксида титана и кремния [62], комплексы железо (III)-хлорпорфирин [63] и др. В этих работах было показано влияние низкомолекулярных веществ на структуру кристаллической и аморфной фаз волокон ПГБ. В данном разделе будет представлено рассмотрение структуры и свойств ультратонких волокон ПГБ, полученных электроформованием и содержащих иммобилизованное ЛВ — комплекс 2-валентного цинка с фенилпорфиринном.

Сегодня достоверно установлено, что комплексы металлов с тетрафенил-порфиринами (ТФП) обладают уникальными фотокаталитическими и антимикробными свойствами [64, 65]. Поэтому создание волокнистых биополимерных матриц с высокой удельной поверхностью способно эффективно удерживать соединения порфиринов, что создает перспективы создания новых бактерицидных материалов. Для разработки фибриллярных систем с заданными свойствами необходимо установить взаимосвязь строения низкомолекулярных комплексов, их концентрации в полимерном растворе со структурно-динамическими параметрами полимерных ультратонких волокон и материалов на их основе.

В предыдущих работах [61, 66] было обнаружено, что низкие концентрации различных соединений, введенных в полимерный раствор ПГБ, приготовленный для ЭФ, оказывают влияние на форму и геометрию полученного полимерного волокна (диаметр, наличие утолщений по длине волокна и отношение длины цилиндрических и эллипсоподобных структур).

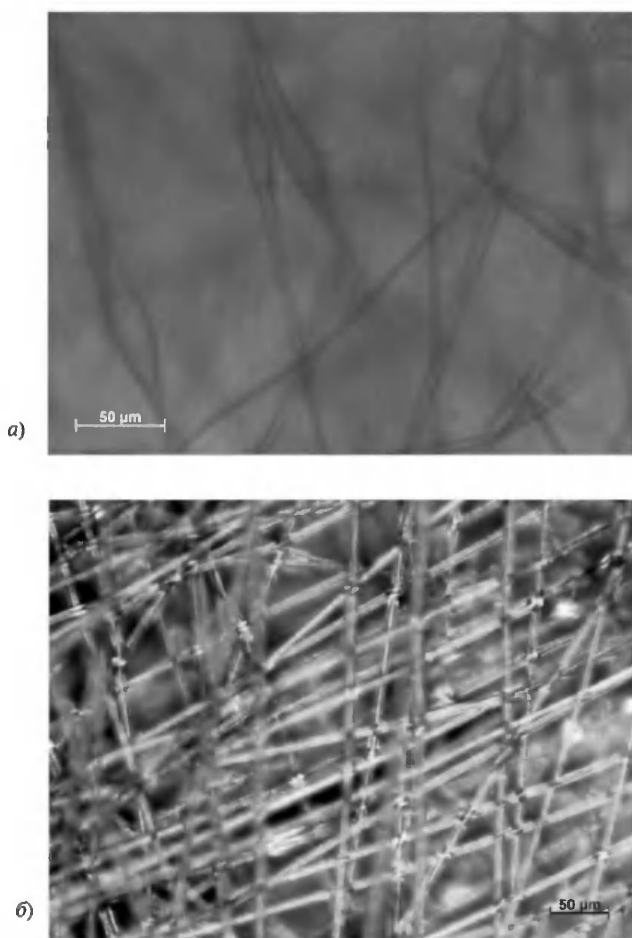
В результате электроформования изменение формы и диаметра волокна зависит от вязкости и электропроводности раствора [67]. При добавлении в раствор ПГБ малых концентрации полярных веществ образуются межмолекулярные водородные связи, как это наблюдалось, например, в системе ПГБ-хитозан. При этом меняются скорость кристаллизации, а также степень ориентации и время релаксации полимерных макроцепей при отверждении волокна в струе формовочного раствора.

На рис. 9.3 показано, что добавление в раствор ПГБ порфиринового комплекса – Zn(II)-тетрафенилпорфирин (ZnТФП) – приводит к существенному изменению геометрии волокна. У исходного ПГБ (рис. 9.3, а) наблюдается чередование цилиндрических и веретенообразных участков вдоль оси волокна. Наличие подобных утолщений можно объяснить низкими, а значит неоптимальными для технологии значениями электропроводности и поверхностного натяжения полимерного раствора [68]. Согласно микрофотографиям средний диаметр цилиндрических участков волокна лежит в области 13 мкм, а эллипсоподобные элементы имеют в несколько раз большие поперечные размеры с диаметром  $\sim 10$  мкм и протяженностью 2040 мкм.

При добавлении в раствор 3–5% ZnТФП веретеноподобные элементы в структуре волокна не проявляются, и на микрофотографии видны цилиндрические структуры (рис. 9.3, б). При введении полярных комплексов ZnТФП исчезновение эллипсоподобных утолщений можно объяснить изменением состояния формовочного раствора, а именно увеличением его электропроводности. Повышение проводимости изменяет электродинамические условия вблизи отверстия капилляра и устраняет биение формовочной полимерной струи [69]. При увеличении электропроводности вытягивание капли раствора в поле действия электродинамических сил происходит более интенсивно, что влечет за собой получение однородных по оси волокон. В случае электроформирования волокна из растворов с низкой электропроводностью, таким является раствор ПГБ в хлороформе, в межэлектродном пространстве может появиться коронный разряд, аналогичный тому, что сопровождает электроформование из расплава [70]. Этот разряд, образующийся преимущественно на поверхности струи формовочного раствора в области выхода из капилляра, уменьшает концентрацию электрических носителей и приводит к отклонению истекаемого полимерного раствора от оси электрического поля, задаваемого электродами. В результате в волокне появляются каплеобразные или веретеноподобные фрагменты, подобно тем, что наблюдаются на рис. 9.3 для полимерных растворов, не содержащих ZnТФП или содержащих его в малых количествах (1%).

Добавление в формовочный раствор электропроводящего компонента, ZnТФП, в более высоких концентрациях 3–5% приводит к расширению

дисперсии диаметра волокна, но сохранению его цилиндрической формы. Помимо вышеуказанного эффекта, связанного с проводимостью полимерной жидкой струи, дальнейшее возрастание концентрации комплекса вызывает рост ее вязкости за счет донорно-акцепторного взаимодействия молекул комплекса с сложноэфирными группами ПГБ, что также препятствует деформации волокна. Следовательно, рост электропроводности и вязкости в системе ПГБ-ЛВ приводит к стабилизации геометрической формы струи без ее отклонения от направления силовых линий электрического поля.



**Рис. 9.3.** Микрофотографии волокнистых материалов ПГБ (а) и ПГБ-ZnТФП 5% (б)



### Влияние ЛВ на сегментальную подвижность биополимера в ультратонких волокнах

Структура межкристаллических областей в волокнах, содержащих ЛВ, непосредственно связана с состоянием кристаллической фазы полимера-носителя путем пространственной организации проходных цепей. Последнее в случае высокой степени кристалличности испытывают деформацию и конформационные пространственные затруднения. Поэтому необходимо различать две альтернативные ситуации, первая: когда степень кристалличности низка и расстояние между кристаллитами и ламелями полимера велико, так что относительно низкая концентрация ЛВ равномерно распределяется между полимерными кристаллами и должна слабо влиять на конформацию незакристаллизованных полимерных молекул.

Альтернативная ситуация возникает, когда в высококристаллических полимерах (таких, как ПГБ, PLA, полиамид-6 и т. п.) созданы условия для реализации максимальной степени кристалличности, например в результате пластификации растворителем или вследствие температурного отжига. В этом случае доля полимерных сегментов, включенных в некристаллические области, относительно мала, механическое и диффузионное поведение полимера определяется состоянием вытянутых проходных цепей, а концентрация введенного ЛВ, отнесенная к объему межкристаллической фазы, может превышать его термодинамическую растворимость. Тогда избыток низкомолекулярного компонента вытесняется из объема полимера с образованием самостоятельной фазы ЛВ на поверхности волокна, а оставшиеся в объеме молекулы ЛВ потенциально способны влиять на конформацию и динамику полимерных молекул в межкристаллических областях полимера.

Структуру и молекулярную динамику этих областей в биополимерных волокнах эффективно можно исследовать методом ЭПР с использованием разработанной в ИХФ РАН микрозондовой техники стабильных нитроксильных радикалов [71]. С позиций вышесказанного рассмотрим спектральные характеристики радикала ТЕМПО в волокнах ПГБ. На рис. 9.4 представлена серия соответствующих спектров для ультратонких волокон ПГБ с различным содержанием порфиринового комплекса: Zn(II)-тетрафенилпорфирин (**ZnТФП**).

Каждый из присутствующих спектров имеет сложный вид и представляет суперпозицию двух более простых спектров, которые соответствуют двум популяциям радикалов, распределенных в межкристаллическом пространстве нановолокна, с сильно различающимися временами корреляции  $\tau_1$  и  $\tau_2$ , где  $\tau_1$  характеризует медленную молекулярную подвижность (вращательную подвижность) в более плотных межкристаллических областях,

а  $\tau_2$  — быструю подвижность зонда в менее плотных, условно аморфных областях (рис. 9.5).

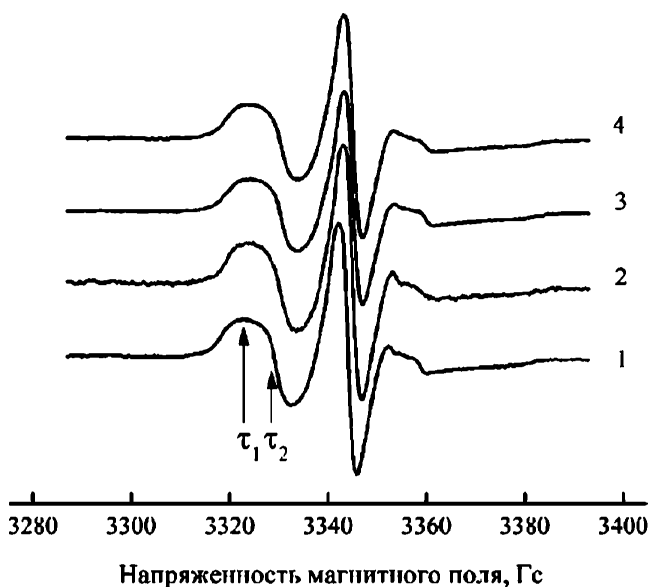


Рис. 9.4. Спектры ЭПР нитроксильного радикала TEMPO образцов ПГБ-ZnTFП; 1 — 0%, 2 — 1%, 3 — 3%, 4 — 5%

Удовлетворительное совпадение расчетных и экспериментальных результатов, представленное на этом рисунке, свидетельствует, прежде всего, об эффективности выбранной 2-фазной модели межкристаллического пространства волокна ПГБ, состоящего из более плотных и менее плотных областей с соответствующими различными вращательными подвижностями стабильного радикала в этих областях.

Оценка соотношения концентраций двух популяций радикалов, занимающих различные по плотности области ПГБ, была проведена путем математической обработки спектров, используя специальную программу NLSL [72], аналогично процедуре, описанной ранее в работах [72, 73]. Результаты расчетов представлены в табл. 9.1.

Нижние индексы 1 и 2 относятся, соответственно, к плотным (паракристаллическим) и менее плотным (рыхлым) областям межкристаллитного пространства.  $\Delta H_M$  — удельная теплота плавления, и  $\alpha_c$  — степень кристалличности ПГБ.

Из данных табл. 9.1 следует, что с ростом концентрации Zn-порфиринового комплекса в волокне доля плотных областей возрастает приблизительно в 6 раз (2-я колонка справа). По мере роста содержания ZnTFП время корреляции в плотных областях полимера также увеличивается. Причем инкапсуляция порфиринового комплекса в малых количествах

(1%) приводит к заметному уменьшению подвижности радикала по сравнению с исходным волокном ПГБ. При дальнейшем увеличении концентрации комплекса (с 3 до 5%) в плотных областях наблюдается более плавный рост времени корреляции радикала ( $\tau_1$ ). Следует отметить, что аналогичная тенденция имеет место для зависимости удельной энтальпии плавления ПГБ ( $\Delta H_M$ ) от концентрации ZnТФП. Значения  $\Delta H_M$ , полученные на основании пиков плавления кривых ДСК, позволили рассчитать величину степени кристалличности при условии, что удельная энтальпия плавления полностью кристаллического ПГБ равна 146 Дж/г [74].

**Таблица 9.1.** Эффективное время корреляции ( $\tau$ ) и объемное соотношение паракристаллических (плотных) ( $\alpha_1$ ) и аморфных ( $\alpha_2$ ) областей в ультратонком волокне ПГБ, содержащем 1–5 мас.% комплекса Zn(II)-тетрафенилпорфирин

Содержание ЛВ	$\tau \times 10^{10}$ с		$\tau \times 10^{10}$ с, отжиг 140 °С		$\alpha_1/\alpha_2$ %	$\Delta H_M$ Дж/г	$\alpha$ %
	плотная область	рыхлая область	плотная область	рыхлая область			
0%	807	57	73	6	31	86	61
1%	10	6	57	75	62	93	65
3%	117	61	59	79	11	94	66
5%	125	69	58	81	19	96	68

Аналогичный рост концентрации плотных областей в присутствии ЛВ наблюдался и для другой композиционной системы ПГБ-ДПД (здесь ДПД – аббревиатура дипиридамола). Соответствующие расчеты показали, что объемная доля плотных областей в межкристаллическом пространстве волокон ПГБ намного превосходит содержание менее плотных областей. Более того, при добавлении в волокно ЛВ оно продолжает слабо увеличиваться в соответствии с последовательностью

$$0,90(0) < 0,93(1) < 0,94(3) < 0,95(5),$$

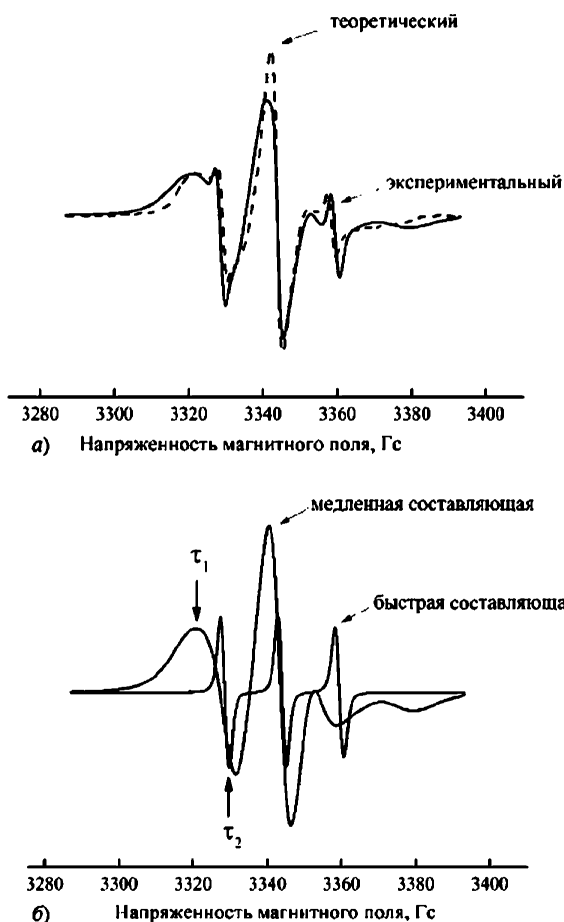
где цифрами в скобках обозначены процентные по массе концентрации ДПД. Такой результат представляется вполне естественным, если учесть, что в этой же последовательности меняется и удельная энтальпия плавления ПГБ, отражающая, как и в предыдущем случае, степень его кристалличности.

По мере роста концентрации плотной фракции в межкристаллитных областях ПГБ наблюдается соответствующее снижение скорости вращения радикала, и, следовательно, происходит замедление сегментальной подвижности макромолекул. Как и в композиционной системе ПГБ-ZnТФП, для медленной составляющей вращательной подвижности наблюдаются аналогичные изменения значений  $\tau_1$  в волокне, а именно величина этого

динамического параметра увеличивается с ростом содержания ДПД в последовательности

$$6,6 \times 10^{-9}(0\%) > 7,1 \times 10^{-9}(1\%) > 8,8 \times 10^{-9}(3\%) > 9,0 \times 10^{-9} \text{ с}(5\%),$$

что свидетельствует о замедлении молекулярной подвижности радикала и, соответственно, снижении молекулярной подвижности цепей ПГБ в межкристаллитных областях.



**Рис. 9.5.** Типичный пример сопоставления экспериментальных и теоретических спектров ЭПР радикала ТЕМПО в образце ПГБ (а); деконволюция этого же спектра на быструю и медленную составляющие (б)

Время корреляции для быстрой составляющей во всех образцах, за исключением ПГБ с 5% ДПД ( $7 \times 10^{-10}$  с) составляло  $2,4 \times 10^{-10}$  с, т. е. более чем на порядок ниже предыдущих значений  $\tau_1$ . Следовательно, изменение кристаллической фазы полимера влияет на динамику цепей в более плотных областях межкристаллитного пространства и практически не оказывает влияния на быструю составляющую их подвижности в менее плотных

межкристаллических областях. Данные результаты могут получить свое объяснение в рамках модели гетерогенного (бинарного) строения межкристаллических областей полимеров с высокой степенью кристалличности [75, 76]. Инкапсуляция парамагнитного зонда в области выпрямленных проходных цепей, т. е. в более плотных паракристаллических областях, в частности вблизи поверхности кристаллов, должно привести к зависимости динамики его вращения от концентрации кристаллической фазы и степени ее удаления от термодинамического равновесия (совершенства).

Совершенство кристаллической структуры нановолокон зависит от условий электроформования, а именно от скорости десорбции растворителя из формуемого волокна и температурного режима его охлаждения [70]. Действительно, фрагменты полимерной цепи с преобладанием выпрямленной конформации принимают основное участие в формировании паракристаллических областей и докристаллизации полимера. Поэтому молекулы зонда с временем корреляции  $\tau_1$  в паракристаллических областях оказываются чувствительными к изменению степени кристалличности ПГБ. Напротив, молекулы этого же зонда, размещенные на значительном расстоянии от кристаллов в областях с быстрой сегментальной подвижностью и приближающиеся по своим динамическим характеристикам к аморфной фазе полимера, практически не подвержены влиянию кристаллической фазы волокна и в некоторых пределах сохраняют свое постоянное значение.

### **Влияние прогрева волокон ПГБ, содержащих комплекс ZnТФП, на молекулярную динамику полимерных цепей**

При электроформовании в результате сложных условий охлаждения и отверждения ультратонких волокон их полимерная структура может находиться достаточно далеко от состояния термодинамического равновесия. Несовершенство кристаллической фазы и морфологии проявляется в недостаточной ориентации сегментов в волокне, а также в нетипично низкой степени кристалличности [70]. В этом случае для расширения представлений о структуре и кристалличности волокна, а также чтобы способствовать переходу полимера к равновесию, применяется термический отжиг, проводимый в коридоре между температурами стеклования и плавления полимера.

Для волокон ПГБ отжиг позволяет получить дополнительную информацию о кристаллическом состоянии этого полимера, т. к. возможна его докристаллизация и перераспределение совершенных и несовершенных кристаллических форм. Совершенствование кристаллической фазы и особен-

но дополнительная кристаллизация происходит при участии проходных полимерных молекул. Поэтому следует ожидать изменение динамики вращения зонда ЭПР, распределенного в межкристаллическом пространстве биополимера, и меняющего частоту вращения (время корреляции) в ответ на изменение сегментальной подвижности молекул ПГБ. Более того, при сравнении подвижностей стабильного радикала в исходном и отожженном биополимере появляется дополнительная возможность определить влияние инкапсуляции ЛВ на устойчивость и динамику межкристаллической структуры.

Температурное воздействие, а именно термический отжиг на несколько десятков градусов ниже температуры плавления ПГБ ( $T_{пл} \approx 175 \text{ }^\circ\text{C}$ ), позволяет резко интенсифицировать сегментальную подвижность и перевести систему к более термодинамически равновесному состоянию. Действительно, время термического отжига при  $140 \text{ }^\circ\text{C}$  для комбинаций ПГБ-ЛВ при отсутствии или низком содержании ЛВ для ряда образцов существенным образом влияет на динамику вращения радикала ТЕМПО. Тогда как для высококристаллических волокон (с 3 и 5% ДПД) этот процесс оказывает слабое воздействие на вращательную подвижность зонда, отражающую сегментальную подвижность цепей (рис. 9.6).

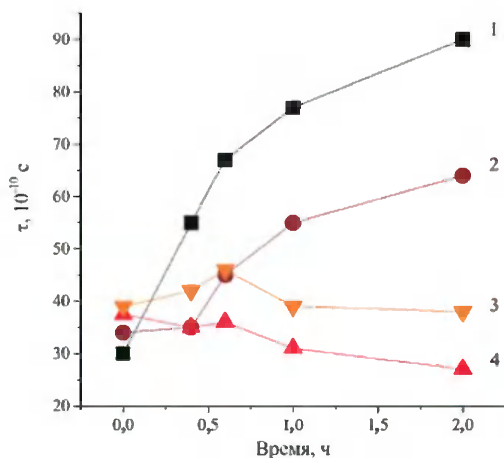


Рис. 9.6. Зависимости эффективного времени корреляции ( $\tau$ ) от времени отжига при  $140 \text{ }^\circ\text{C}$ : 1 — ПГБ, 2 — ПГБ с 1%, 3 — ПГБ с 3%, 4 — ПГБ с 5% ДПД

Один из возможных механизмов докристаллизации ПГБ при температурном отжиге волокна заключается в том, что часть сегментов цепи с высокой степенью ориентации  $\beta$ , которая была приобретена в процессе электроформования, достигает значений больше критического значения  $h/L \sim \sqrt{2/l}$ , где  $h$  — расстояние между концами цепей,  $L$  — персистентная длина цепи, и  $l$  — длина единичного сегмента [77]. В результате для полимерных волокон при повышенных температурах можно наблюдать рост

степени кристалличности и концентрации паракристаллических структур в объеме волокна. В результате сорбционная способность волокна по отношению к парамагнитному радикалу снижается. Действительно, измерения концентрации стабильного радикала в волокнах также показывают резкое уменьшение этой величины после отжига в течение 2 часов. Так, например, в исходных волокнах ПГБ концентрация радикала после абсорбции из паров составляла  $8 \times 10^{15}$  спин/г, тогда как это значение после отжига в течение 2 часов снизилось до  $1,4 \times 10^{15}$  спин/г. Аналогичная картина наблюдалась и для других волокон биополимера, содержащих порфириновый комплекс.

Таким образом, как показывает комбинация динамических характеристик и термофизических параметров, между содержанием кристаллической фазы ПГБ (структурная характеристика) и величиной времени корреляции (динамическая характеристика) наблюдается определенное соответствие, так что молекулярная подвижность снижается по мере уменьшения общего объема межкристаллитных областей из-за роста кристалличности ПГБ и, следовательно, вовлечения все большего числа подвижных полимерных сегментов в плотные области полимера с низкой подвижностью и высокими значениями  $\tau_2$ .

На основании полученных результатов можно заключить, что в присутствии ЛВ из раствора ПГБ методом электроформования образуются ультратонкие волокна различной геометрии со структурой различной степени равновесия и совершенства, что справедливо как для кристаллической фазы, так и для межкристаллитных областей, где возможно перераспределение между аморфным и паракристаллическим состоянием ПГБ. Неравновесность межкристаллических областей для ПГБ с отсутствием или низким содержанием биологически активных веществ (ZnТФП и ДПД) находит свое подтверждение в изменении вращательной подвижности стабильного радикала и возрастании кристалличности. Все результаты, включающие влияние концентрации ЛВ на форму волокна, его динамические характеристики, находятся в хорошем соответствии с термофизическими параметрами системы и должны найти непосредственное приложение при описании направленного и пролонгированного транспорта биоактивных соединений.

Естественным продолжением этих исследований является переход от структурных характеристик ультратонких волокон к изучению диффузионной кинетики лекарственного вещества в их объеме. В следующем разделе представлены результаты зависимости диффузионного транспорта как основного процесса, ответственного за контролируемое высвобождение ЛВ, от геометрических размеров волокна, его кристалличности и пористости фибриллярных пленок. Полученные результаты использованы при

рассмотрении диффузионной кинетики, которая в сочетании с анализом сегментальной динамики представляет два основополагающих процесса, определяющих скорость и механизм контролируемого высвобождения ЛВ из фибриллярных терапевтических систем.

### **Диффузия и контролируемое высвобождение ЛВ в ультратонких волокнах ПГБ и в фибриллярных пленках на их основе**

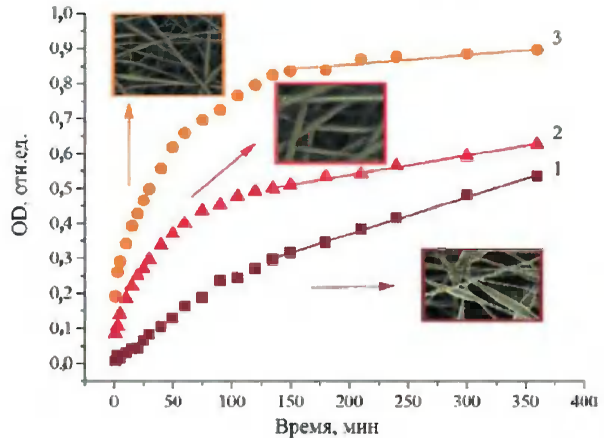
Процесс контролируемой адресной доставки биологически активных веществ, например противовоспалительных и антидиабетических лекарств или гормона роста [78–80], не может быть адекватно описан без рассмотрения их диффузионного транспорта. В этой связи, несмотря на впечатляющие технологические достижения в создании ультратонких полимерных волокон различного применения, решение диффузионных и ферментативно-гидролитических проблем в системах «монофиламент — БАВ» и «фибриллярная матрица — БАВ» встречается в крайне ограниченном числе работ (см., например, [81–83]) и требует углубленного анализа как на экспериментальном, так и на теоретическом уровнях. Рассмотрение вышеупомянутой диффузионно-кинетической задачи было проведено на примере ультратонких волокон с инкапсулированным ЛВ. Сочетая результаты транспорта в волокнах и фибриллярных мембранах со структурно-динамическими характеристиками биополимерного носителя, предлагается непротиворечивая модель контролируемого высвобождения, удовлетворительно описывающая комбинацию диффузии БАВ и кинетики гидролиза в инновационной терапевтической системе на основе типичного биоразлагаемого полиэфира (ПГБ).

На рис. 9.7 приведены типичные кинетические кривые высвобождения дипиридамола (ДПД) из волокон различной геометрии, состоящих из эллипсоподобных и цилиндрических структур и с различной концентрацией ЛВ. Как и в случае системы «монолитная пленка ПГБ — ЛВ» [84], для фибриллярной матрицы, образованной ультратонкими волокнами ПГБ, кинетические профили высвобождения имеют две характерных кинетических области линейного и нелинейного вида. Бимодальный характер контролируемого высвобождения особенно отчетливо проявляется для волокон с более высоким содержанием ДПД в волокне (3 и 5 мас. %). В соответствии с предложенной моделью, начальный нелинейный участок преимущественно определяется диффузионным процессом с характеристическим коэффициентом диффузии ЛВ, тогда как линейная область соответствует кинетическому процессу деградации волокна с частичной потерей его массы за счет гидролиза сложноэфирных функциональных



групп ПГБ. В процессе гидролитической деструкции ЛВ, инкапсулированное в волокне, переходит в окружающий водный раствор не только в результате диффузии, но и в результате частичной дисинтеграции волокна по механизму поверхностной деструкции или эрозии [85].

**Рис. 9.7.** Типичные кинетические профили контролируемого высвобождения ДПД из волокон ПГБ. Концентрация ДПД 1(1), 3(2) и 5 мас.% (3). СЭМ микрофотографии иллюстрируют форму волокон; увеличение в масштабе 1 : 1000 (OD — оптическая плотность)



При такой формулировке задачи кинетический профиль высвобождения ЛВ описывается следующей системой уравнений. В течение интервала времени  $\Delta t$  кумулятивная масса ЛВ, высвободившегося из фибриллярной пленки к моменту времени  $t$  ( $\Delta M_{\text{ЛВ}}(t)$ ), представляет сумму двух слагаемых: количества ЛВ, поступившего в объем раствора по диффузионному механизму ( $\Delta M_D$ ), и количества лекарственного вещества, перешедшего в раствор в результате частичной потери массы волокна  $\Delta M_f$ , в которой было заключено  $\Delta M_k$  граммов ЛВ, иммобилизованного полимерными молекулами и не способного к диффузии в полимерной среде. Сказанное выше отражает простой баланс изменения массы активного компонента в волокне:

$$\frac{\Delta M_{\text{ЛВ}}}{\Delta t} = \frac{\Delta M_D}{\Delta t} + \frac{\Delta M_k}{\Delta t}. \quad (9.1)$$

При постоянстве объема окружающего раствора  $V$  и интенсивном перемешивании внешнедиффузионными ограничениями можно пренебречь. В этом случае для фибриллярной пленки по аналогии с монолитной непористой пленкой [85] можно записать дифференциальное уравнение, демонстрирующее одновременный вклад диффузии ЛВ и гидролиза ПГБ по кинетике нулевого порядка

$$\frac{\partial M_{\text{ЛВ}}/\partial t}{V} = \frac{\partial C_{\text{ЛВ}}}{\partial t} = D_{\text{эф}} \frac{\partial^2 G_{\text{ЛВ}}}{\partial x^2} + k_h, \quad (9.2)$$

где  $C_{\text{ЛВ}}$  и  $G_{\text{ЛВ}}$  — общая концентрация лекарственного вещества, поступившая во внешний объем  $V$  к моменту времени  $t$  и концентрация подвижной фракции ЛВ, способная диффундировать в полимерном образце с соответствующим эффективным коэффициентом диффузии  $D_{\text{эф}}$ , не зависящим от координаты и времени, и  $k_h$  — константа потери массы волокна, преимущественно за счет гидролиза сложноэфирных групп ПГБ.

В фибриллярной пленке, образованной беспорядочным переплетением ультратонких волокон,  $D_{\text{эф}}$  определяется двумя сопряженными процессами: диффузионной подвижностью молекул ЛВ в объеме волокна ( $D_f$ ) и его диффузионным транспортом в межфибрилярном пространстве, заполненном растворителем ( $D_w$ ). Следовательно, общий перенос может аппроксимироваться моделью псевдо-двухслойной среды. В соответствии с моделями Кранка [86] и Мэкки-Мирса [87], соотношение между эффективным коэффициентом диффузии ( $D_{\text{эф}}$ ), индивидуальными диффузионными константами ( $D_f$ ,  $D_w$ ) и геометрическими характеристиками системы ( $L_M$ ,  $R_f$  и  $L_w$ ) имеет вид:

$$\frac{L_M}{2D_{\text{эф}}} = \frac{R_f}{D_f} + \frac{L_w}{2D_w}. \quad (9.3)$$

Здесь  $R_f$  и  $L_w$  — средние характеристические размеры длины диффузионного пути ЛВ в волокне и межволоконном пространстве соответственно, а  $L_M$  — толщина фибриллярной пленки.

С учетом симметрии пленки при двухсторонней десорбции ее размер и диаметр волокна поделены на два. Для цилиндрического волокна длина диффузионного пути определена его радиусом, тогда как для  $L_w$ , мы воспользовались поправкой на увеличения диффузионного пути из-за огибания молекулой ЛВ хаотично расположенных цилиндрических волокон. Поправка на непроницаемые препятствия впервые была введена в классической работе Мэкки и Мирса [87] и недавно была использована для описания транспорта в магнитном композите на основе хитозана и ПГБ [88]:

$$L_w = \frac{1 + \phi_f}{1 - \phi_f} 2L_M, \quad (9.4)$$

где  $\phi_f$  — объемная доля полимерных волокон в фибриллярной пленке, величины которых, так же как и среднестатистические радиусы, приведены в табл. 9.2.

С учетом вводимой корреляции длины диффузионного пути в водной фазе, а также принимая во внимание поправку на степень кристалличности полимера  $F_c = (1 - \alpha_c)$ , предложенную в монографии [89], уравнение (9.4) принимает более развернутый вид:

$$\frac{L_M}{D_{\text{эф}}} = \frac{R_f}{[1 - \alpha_c]D_f} + 2 \frac{1 + \phi_f}{1 - \phi_f} \frac{L_M}{D_w}, \quad (9.5)$$

позволяющий перейти к сопоставлению вклада двух процессов, определяющих общий процесс переноса, а именно диффузии ЛВ в волокне и диффузии в водном межфибриллярном пространстве пленки ПГБ. Предварительная оценка значений коэффициентов диффузии ЛВ в ПГБ ( $D_f$ ) показала, что они на несколько порядков ниже соответствующего коэффициента в водном межфибриллярном пространстве. Т. е. последнее слагаемое в правой части уравнения (9.5) намного меньше первого, и выражение для диффузионного коэффициента ЛВ в ПГБ упрощается:

$$D_f = R_f D_{\text{эф}} / L_M F_c. \quad (9.6)$$

Здесь геометрические ( $\phi_f$ ,  $L_M$ ) и структурная ( $F_c = 1 - \alpha_c$ ) характеристики были определены нами выше из данных СЭМ и ДСК соответственно.

Упрощение уравнения (9.5) до выражения (9.6) возможно при условии, что лимитирующей стадией десорбции ЛВ из фибриллярной пленки толщиной  $L_M$  является его диффузия в полимерной среде волокна. Подобный вывод не является универсальным, так как при росте объема межфибриллярного пространства системы, т. е. при снижении доли волокна и его менее плотной укладке, а также при возрастании концентрации гидрофильных групп в полимере, т. е. при увеличении их сродства к полярному растворителю (например, к воде) и соответствующему росту  $D_f$ , возможен учет обоих слагаемых, величины которых могут быть вполне сопоставимыми.

Уравнение диффузии для бесконечного цилиндра, который удовлетворительно аппроксимирует форму волокна, и при условии, что ЛВ в начальный момент времени равномерно распределено по объему полимера, было представлено Кранком в его классической работе [86]:

$$\partial G_{\text{ЛВ}} / \partial t = (1/r) D_f [\partial(r \partial G_{\text{ЛВ}} / \partial r) / \partial r], \quad 0 < r < R_f, \quad (9.7)$$

где  $r$  — радиальная координата диффузии, а символ  $G_{\text{ЛВ}}$ , как и в уравнении (9.2), обозначает концентрацию подвижной фракции лекарственного вещества в цилиндрическом волокне с соответствующим постоянным коэффициентом диффузии  $D_f$ ;  $R_f$  — как и ранее, обозначает средний радиус волокна.

Начальное и граничные условия, соответствующие десорбции ЛВ из цилиндрического волокна, имеют вид:

$$\begin{aligned} G_{\text{ЛВ}} &= G_{0\text{ЛВ}} && \text{при } t = 0 \text{ в диапазоне } 0 < x < R_f; \\ G_{\text{ЛВ}} &= 0 && \text{при } r = R \text{ (на границе волокно-раствор) при } t > 0. \end{aligned}$$

Второе граничное условие записывается из соображений симметрии и указывает на отсутствие потока в центре единичного волокна  $\partial G_{\text{ЛВ}} / \partial r = 0$  при  $r = 0$ .

В работе [90] показано, что решение уравнения (9.7) имеет вид степенной функции и позволяет получить зависимость кумулятивного количе-

ства ЛВ, поступающего из волокна в окружающую среду по диффузионному механизму  $\Delta M_D(t)$ , от его времени контакта с этой средой  $t$ :

$$\Delta M_D / \Delta M_{D\infty} = [16D_f / \pi R_f^2]^{1/2} t^{1/2} - [D_f / R_f^2] t, \quad (9.8)$$

где  $\Delta M_{D\infty}$  — предельное значение  $\Delta M_D$  при условии  $t \rightarrow \infty$ .

Отметим, что уравнения (9.7) и (9.8), описывающие диффузию ЛВ через боковые стенки бесконечного цилиндра, справедливы при условии, что длина волокна превосходит его радиус как минимум в 5 раз [91] и это требование строго выполняется для волокон практически бесконечной длины, получаемых технологией электроформования. Кроме того, последнее уравнение справедливо при условии неравенства  $\Delta M_D / \Delta M_{D\infty} < 0,4$ . Комбинация уравнений (9.2) и (9.8) дает конечное выражение для высвобождения лекарственного вещества из цилиндрических волокон как с учетом потери массы при гидролизе, так и за счет диффузии лекарственного вещества:

$$\Delta M_{ЛВ} / \Delta M_{ЛВ\infty} = [16D_f / \pi R_f^2]^{1/2} t^{1/2} + k_c t, \quad (9.9)$$

здесь  $k_c = k_h - [D_f / R_f^2]$ . Положительный знак в уравнении показывает, что в данных условиях для ПГБ выполняется неравенство  $k_h > [D_f / R_f^2]$ .

По своей форме экспериментальные кривые, приведенные на рис. 9.7, соответствуют уравнению (9.9), которое позволяет рассчитать коэффициенты диффузии в волокне  $D_f$ . Для расчетов эти кривые высвобождения ЛВ были представлены в диффузионных координатах  $M_D / M_{\infty} \sim t^{1/2}$ , как это показано на рис. 9.8.

В табл. 9.2 представлены концентрации подвижной  $C_{\infty}^D$  и иммобилизованной  $C_{\infty}^h$  фракций ЛВ.

**Таблица 9.2.** Сорбционные, кинетические и диффузионные характеристики системы волокно ПГБ–ДПД

ДПД мас. %	$R_f \times 10^4$ см <sup>2</sup>	$D_f \times 10^{12}$ см <sup>2</sup> /с	$C_{\infty}^D \times 10^2$ г/г	$C_{\infty}^h \times 10^2$ г/г	$k_c \times 10^5$ , с <sup>-1</sup>	$k_h \times 10^5$ , с <sup>-1</sup>
5	1,6	1,5	3,35(53%)	1,65(34%)	4,4	1,4
3	2,5	3,2	1,8(56%)	0,89(32%)	6,1	1,1
1	9,8*	6,9*	0,78(78%)	0,22(22%)	9,4	8,5*

Концентрация подвижной фракции  $C_{\infty}^D$  и неподвижной  $C_{\infty}^h$  фракции ДПД в волокне;  $C^{Ext}$ —концентрация ДПД в межволоконном пространстве. В скобках указаны проценты каждой фракции. Звездочкой (\*) отмечены условные расчеты соответствующих характеристик, проведенные путем аппроксимации эллипсоидов вращения цилиндрами большего диаметра.

Сопоставление экспериментальных результатов, представленных на рис. 9.6 соответствующими символами, и расчетов по уравнениям (9.7)

и (9.9), отображенных сплошными линиями, свидетельствует об их хорошем соответствии и демонстрирует возможность применения данной модели для оценки диффузионных характеристик ультратонких волокон цилиндрической формы. Несколько худшие результаты были получены для волокна, содержащего 1% лекарственного вещества, что обусловлено структурной неравновесностью аномальных эллипсоподобных фрагментов волокна и требует дальнейшей разработки математического аппарата диффузии в геометрически сложной и неравновесной системе, сочетающей эллипсоиды вращения и цилиндры.

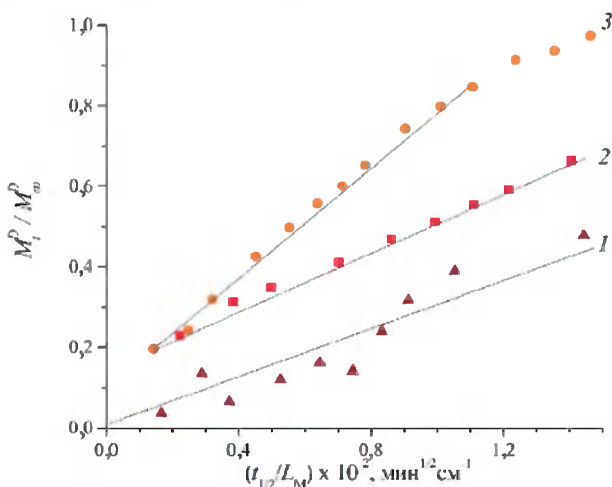


Рис. 9.8. Кинетические кривые высвобождения ДПД из волокон ПГБ, представленные в диффузионных координатах. Концентрация ДПД 1(1), 3(2) и 5 мас.% (3);  $L_M$  — общая толщина фибриллярной пленки

Эффект резкого выброса ЛВ на начальном участке кинетических кривых носит название «взрывной эффект» («burst effect»), который хорошо известен в литературе [92]. Это явление может иметь несколько причин, но в нашем случае оно преимущественно связано с остаточной концентрацией ЛВ, вытесненной из объема волокна в процессе электроформования. Появление этой фракции не превышает 10% и наблюдается только для ультратонких волокон с высокой загрузкой ЛВ ( $> 3\%$ ). При погружении образца в водную среду происходит его удаление из пленки за счет быстрой диффузионной подвижности в оводненном межфибрилярном пространстве. Следует также отметить, что концентрация подвижных молекул лекарственного вещества уменьшается с ростом кристалличности и поэтому достигает максимального значения для волокон, содержащих 1% ДПД, имеющих наименьшую кристалличность 38%. В последней строке

табл. 9.2 приведены константы выхода ЛВ за счет потери массы волокна в процессе гидролиза ( $k_h$ ). Здесь также можно отметить, что скорость гидролиза снижается с ростом кристалличности волокна и тем ниже, чем выше концентрация лекарственного вещества, находящегося в волокне.

Совокупность известных в литературе и представленных в данной главе результатов позволяет сделать два вывода. Во-первых, межкристаллические области ультратонких волокон ПГБ имеют плотную упаковку цепей, которая существенно выше плотности в аморфной области пленки, что подтверждается результатами измерения сегментальной подвижности методом ЭПР. Кроме того, доля плотных областей аморфной фазы в волокне равна или превышает 95% (остальные 5% принадлежат «рыхлой» фракции межкристаллической фазы), что приводит к возрастанию времени корреляции молекулярного зонда ТЕМПО. Во-вторых, в этих же условиях значения коэффициентов диффузии ЛВ в ультратонких и высококристаллических волокнах ПГБ, а также и в его сферических микрочастицах, содержащих ДПД [93] на несколько порядков ниже, чем аналогичные характеристики, измеренные для пленок ПГБ. Обнаруженное снижение поступательной (для ЛВ) и вращательной (для стабильного радикала ТЕМПО) диффузии в отдельных филаментах волокна определяется высокой ориентацией молекул ПГБ, происходящей под действием продольных гидромеханических и электростатических сил, возникающих при электроформовании.

## Заключение

За последние десять-пятнадцать лет отмечается не только значительный прогресс на уровне теории и моделирования процессов направленного транспорта биологически активных соединений, но одновременно для современной терапии создается большое число полимерных и гибридных материалов, обеспечивающих инновационную составляющую средств доставки ЛВ. Выбор гибридных частиц и ультратонких волокон в качестве эффективных носителей определяется их характеристиками и функциональным поведением, например такими, как высокая удельная поверхность, анизотропия ряда физико-химических характеристик, пространственные ограничения сегментальной подвижности, которые присущи нано-размерным объектам, контролируемая биodeградация, регулируемый диффузионный транспорт и др. Сегодня основной тенденцией является накопление экспериментального материала, показывающего как нанотехнологические процессы, включая электроформование, влияют на характеристики разрабатываемых средств адресной доставки ЛВ.

Современные полимерные материалы для биомедицины должны удовлетворять двум принципиально важным критериям: обладать биосовместимостью и, одновременно, способностью к контролируемой биодеградации, которая не сопровождается образованием токсичных промежуточных и конечных продуктов. При создании биорассасывающихся имплантатов, матриц для клеточной инженерии или терапевтических систем для адресной доставки ЛВ, а также других биомедицинских изделий используется достаточно ограниченный круг гибридных и природных полимеров, среди которых, прежде всего, следует отметить некоторые полисахариды типа хитозана, поли- $\alpha$ -гидроксикислоты (полилактиды различной стереорегулярности и их сополимеры с гликолидом) и поли- $\beta$ -гидроксикислоты в лице их основного представителя ПГБ. Эти биополимеры в виде индивидуальных компонентов или в различных комбинациях с неорганическими носителями в форме наночастиц и волокон требуют дальнейших усилий по изучению их функционального и структурного поведения на академическом и клиническом уровнях. Поэтому в рамках данного учебного пособия, мы показали некоторые принципиально важные точки роста новых систем для доставки ЛВ, отличающиеся от других своей возможностью к биодеградации без нанесения токсического и иммунологического вреда живым системам.

Анализ структуры и функций ПГБ как типичного представителя класса биодеградируемых природных полиэфиров в сочетании с диффузионно-кинетическими процессами предоставляет реальную возможность создания нового поколения терапевтических систем для пролонгированного и направленного высвобождения ЛВ в каркасных системах клеточной инженерии, при создании функциональных имплантов для восстановительной хирургии и при лечении социально значимых заболеваний.

## Благодарности

Глава написана в рамках фундаментальной программы научных исследований РАН АААА-А17-117040610309-0, а также при поддержке Фонда РФФИ, грант № 18-29-05017. Специальная благодарность академику А.А. Берлину и проф. А. Айринштейну за плодотворное обсуждение и ценные замечания.

## Авторы

Бычкова Анна Владимировна, к.х.п., н.с., ИБХФ РАН. Область научных интересов: биосовместимость, белки крови, магнитные наночастицы,

функциональные наноструктуры, спектроскопия ЭПР и ФМР, техника эксперимента.

**Ольхов Анатолий Анатольевич**, к.х.н., с.н.с., ИХФ РАН. Область научных интересов: технология получения нановолокон, их структурные исследования.

**Карпова Светлана Геннадьевна**, к.х.н., с.н.с., ИБХФ РАН. Область научных интересов: сегментальная динамика биополимеров, ЭПР спектроскопия, ДСК.

**Иорданский Алексей Леонидович**, д.х.н., профессор, зав. лаб., ИХФ РАН. Область научных интересов: транспортные явления в полимерных системах.

## Литература

1. *Ariga K., Vinu A., Miyahara M.* Recent progresses in bio-inorganic nanohybrids. — *Current Nanoscience*, 2006, **2**, 197.
2. *Cotilla M., Manzano M., Vallet-Ragí M.* Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications. — *International Journal of Nanomedicine*, 2013, **3**, 403.
3. *Dubey K.A., Chaudhari C.V., Bhardwaj Y.K., Varshney L.* Polymers, blends and nanocomposites for implants, scaffolds and controlled drug release applications. — *Advanced Structured Materials*, 2017, **66**, 1.
4. *Hernández-Gómez L.H., Beltrán-Fernández J.A., Ramírez-Jarquín M., Pava-Chipol N., Pérez-Montejo S.* Characterization of scaffold structures for the development of prostheses and biocompatible materials. *Advanced Structured Materials*, 2019, **92**, 471.
5. *Mann J.L., Yu A.C., Agmon G., Appel E.A.* Supramolecular polymeric biomaterials. — *Biomaterials Science*, 2018, **6**, 10.
6. *LaVan D.A., McGuire T., Langer R.* Small-scale systems for in vivo drug delivery. — *Nature Biotechnology*, 2003, **21**, 1184.
7. *Ishihara T., Mizushima T.* Techniques for efficient entrapment of pharmaceuticals in biodegradable solid micro/nanoparticles. — *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010, **7**, 565.
8. *Haidar M.K., Erol H.* Nanofibers: New insights for drug delivery and tissue Engineering. — *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2017, **17**, 1564.
9. *Bhardwaj N., Kundu S.C.* Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. — *Biotechnology Advances*, 2010, **28**, 325.
10. *Zhang Y., Chen Q., Ge J., Liu Z.* Controlled display of enzyme activity with a stretchable hydrogel. — *Chemical Communications*, 2013, **49**, 84.
11. *Park S., Lee Y., Kim D. N., Park S., Jang E., Koh W. G.* Entrapment of enzyme-linked magnetic nanoparticles within poly(ethylene glycol) hydrogel microparticles prepared by photopatterning. — *Reactive and Functional Polymers*, 2009, **69**, 293.
12. *Thornton P.D., Mart R.J., Ulijn R.V.* Enzyme-responsive polymer hydrogen Hydrogel Particles for Controlled Release. — *Advanced Materials*, 2007, **19**, 1252.
13. *Gupta B., Revagade N., Hilborn J.* Poly(lactic acid) fiber: An overview. — *Progress in Polymer Science*, 2007, **32**, 455.



14. Zhang B., Yan X., He H.-W., Ning X., Long Y.-Z. Solvent-free electro-spinning: Opportunities and challenges. — *Polymer Chemistry*, 2017, **8**, 334.
15. Streicher R.M., Schmidt M., Fiorito S. Nanosurfaces and nanostructures for artificial orthopedic implants. — *Nanomedicine*, 2007, **2**, 861.
16. Li D., Frey M.W., Baemner A.J. Electrospun polylactic acid nanofiber membranes as substrates for biosensor assemblies. — *Journal of Membrane Science*, 2006, **279**, 354.
17. Mikheev A.Y., Shlyapnikov Y.M., Kanev I.L., Avsenko A.V., Morozov V.N. Filtering and optical properties of free standing electrospun nanomats from nylon-4,6. — *European Polymer Journal*, 2016, **75**, 317.
18. Miguel S.P., Figueira D.R., Simões D., Ribeiro M.P. Coutinho P., Ferreira P., Correia I.J. Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review. — *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, **169**, 60.
19. Zhou B., Li Y., Deng H., Hu Y., Li B. Antibacterial multilayer films fabricated by layer-by-layer immobilizing lysozyme and gold nanoparticles on nanofibers. — *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, **116**, 432.
20. Cheng H., Yang X., Che X., Yang M., Zhai G. Biomedical application and controlled drug release of electrospun fibrous materials. — *Materials Science and Engineering*, 2018, **90**, 750.
21. Rebia R.A., Rozet S., Tamada Y., Tanaka T. Biodegradable PHBH/PVA blend nanofibers: Fabrication, characterization, in vitro degradation, and in vitro biocompatibility. — *Polymer Degradation and Stability*, 2018, **154**, 124.
22. Malafeev K.V., Moskalyuk, O.A., Yudin V.E., Sedushche N.G., Chvalun S.N., Elohovskii V. Yu., Popova E.N., Ivan'kova, E.M. Synthesis and properties of fibers prepared from lactic acid-glycolic acid copolymer. — *Polymer Science Series A*, 2017, **59**, 53.
23. Cao K, Liu Y., Olkhov A.A., Siracusan V., Iordanskii A.L. PLLA-PHB fiber membranes obtained by solvent-free electrospinning for short-time drug delivery. — *Drug Deliv. and Transl. Res.*, 2018, **8**, 291.
24. Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. — *Acta biomaterialia*, 2012, **8**, 1401.
25. Sokolova V.V., Radtke I, Heumann R, Epple M. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. — *Biomaterials*, 2006, **27**, 3147.
26. Dorati R., DeTrizio A., Modena T., Conti B., Benazzo F., Gastaldi G., Genta I. Biodegradable Scaffolds for Bone Regeneration Combined with Drug-Delivery Systems in Osteomyelitis Therapy. — *Pharmaceuticals*, 2017, **10**(4), pii: E96. doi: 10.3390/ph10040096.
27. Nandi S.K, Bandyopadhyay S, Das P, Samanta I, Mukherjee P, Roy S, Kundu B. Understanding osteomyelitis and its treatment through local drug delivery system. — *Biotechnol Adv.*, 2016, **34**, 1305.
28. Das S, Baker A. B. Biomaterials and nanotherapeutics for enhancing skin wound healing. — *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2016, **4**, 82.
29. Tran C.D, Duri S, Harkins A.L. Recyclable Synthesis, Characterization and antimicrobial activity of chitozan-based polysaccharide composite materials. — *Journal of biomedical materials research Part A*, 2013, **0**(8), 2248. doi:10.1002/jbm.a.34520.
30. Tan H, Chu C.R, Payne K, Marra K.G. Injectable *in situ* forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. — *Biomaterials*, 2009, **30**, 2499.
31. Song Y, Nagai N, Saijo S, Kaji H, Nishizawa M, Abe T. In situ formation of injectable chitosan-gelatin hydrogels through double crosslinking for sustained intraocular drug delivery. — *Mater. Sci. Eng. C Mater Biol. Appl.*, 2018, **88**, 1.

32. *Vikhoreva G., Bannikova G., Stolbushkina P., Panov A., Drozd N., Makarov V., Varlamov V., Gal'braikh L.* Preparation and anticoagulant activity of a low-molecular-weight sulfated chitosan, *Carbohydr. — Polym.*, 2005, **62**, 327.
33. *Xue J., Zhao W., Nie S., Sun S., Zhao C.* Blood compatibility of polyethersulfone membrane by blending a sulfated derivative of chitosan, *Carbohydr. — Polym.*, 2013, **95**, 64.
34. *Huang X., Wang R., Lu T., Zhou D., Zhao W., Sun S., Zhao C.* Heparin-like chitosan hydrogels with tunable swelling behavior, prolonged clotting times, and prevented contact activation and complement activation. — *Biomacromolecules*, 2016, **17**, 4011.
35. *Zhang L., Ma Y., Pan X., Chen S., Zhuang H., Wang S.* A composite hydrogel of chitosan/heparin/poly ( $\gamma$ -glutamic acid) loaded with superoxide dismutase for wound healing. — *Carbohydr. Polym.*, 2018, **180**, 168.
36. *Qiao X., Peng X., Qiao J., Jiang Z., Han B., Yang C., Liu W.* Evaluation of a photocrosslinkable hydroxyethyl chitosan hydrogel as a potential drug release system for glaucoma surgery. — *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2017, **28**, 149.
37. *Nguyen H.X., O'Leary E.A.* An In Vitro Thrombolysis Study Using a Mixture of Fast-Acting and Slower Release Microspheres. — *Pharm. Res.*, 2016, **33(7)**, 1552.
38. *Dobiasch S., Szanyi S., Kjaev A., Werner J., Strauss A., Weis C., Grenacher L., Kapilov-Buchman K., Israel L.L., Lellouche J.P., Locatelli E., Comes Franchini M.C., Vandoooren J., Opdenakker G., Felix K.* Synthesis and functionalization of protease-activated nanoparticles with tissue plasminogen activator peptides as targeting moiety and diagnostic tool for pancreatic cancer. — *J. Nanobiotechnology*, 2016, **14**, 81.
39. *Zhang L.L., Li P., Li Y.M., Wang A.Q.* Preparation and characterization of magnetic alginate-chitosan hydrogel beads loaded matrine. — *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2012, **38**, 872.
40. *Zhang Y., Sun Y., Yang X., Hilborn J., Heerschap A., Ossipov D.A.* Injectable in situ forming hybrid iron oxide-hyaluronic acid hydrogel for magnetic resonance imaging and drug delivery. — *Macromol Biosci.*, 2014, **14**, 1249.
41. *Иорданский А.Л., Роговина С.З., Берлин А.А.* — Обзорный журнал по химии, 2013, **2**, 129.
42. *Leoni L., Desai T.A.* Nanoporous biocapsules for the encapsulation of insulinoma cells: biotransport and biocompatibility considerations. — *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 2001, **48**, 11, 1335.
43. *Соснов А.В., Иванов Р.В., Балакин К.В., Шоболов Д.Л., Федотов Ю.А., Калмыков Ю.М.* Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц. — *Качественная клиническая практика*, 2008, **2**, 4.
44. *Rajangam T, An S.S.* Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications. — *International Journal of Nanomedicine*, 2013, **8**, 3641.
45. *Ziv-Polat O, Skaat H, Shahar A, Margel S.* Novel magnetic fibrin hydrogel scaffolds containing thrombin and growth factors conjugated iron oxide nanoparticles for tissue engineering. — *International Journal of Nanomedicine*, 2012, **7**, 1259.
46. *Агапова О.И.* Биоинженерные конструкции на основе фибрина шелка и спидроина для регенеративной медицины и тканевой инженерии. — *СТМ*, 2017, **2**, 190.
47. *Гомзяк В.И., Демина В.А., Разуваева Е.В., Седуш Н.Г., Чвалун С.Н.* Биоразлагаемые полимерные материалы для медицины: от импланта к органу. — *Тонкие химические технологии*, 2017, **5**, 5.
48. *Kinard L.A, Kasper F.K, Mikos A.G.* Synthesis of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate). — *Nature protocols*, 2012, **7**, 1219.
49. *Santoro M., Tatara A.M., Mikos A.G.* Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. — *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 2014, **190**, 210.

50. *Modaresi S.M., Mehr S.E., Faramarzi M.A., Gharehdaghi E.E., Azarnia M., Modarressi M.H., Baharifar H., Vaez S.J., Amani A.* Preparation and characterization of self-assembled chitosan nanoparticles for the sustained delivery of streptokinase: An in vivo study. — *Pharm. Dev. Technol.*, 2014, **19**, 593.
51. *Jin H.J., Zhang H., Sun M.L., Zhang B.G., Zhang J.W.* Urokinase-coated chitosan nanoparticles for thrombolytic therapy: Preparation and pharmacodynamics in vivo. — *J. Thromb. Thrombolysis*, 2013, **36**, 458.
52. *Mourino V, Boccaccini A. R.* Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. — *Journal of the Royal Society Interface*, 2010, **7**, 209.
53. *Демина П.А., Григорьев Д.О., Кузьмичева Г.М., Букреева Т.В.* Создание капсул на основе эмульсий пикеринга с оболочками из наночастиц диоксида титана и полиэлектролитных слоев. — *Коллоидный журнал*, 2017, **79**, 142.
54. *Zhao F, Yao D, Guo R, Deng L, Dong A, Zhang J.* Composites of Polymer Hydrogels and Nanoparticulate Systems for Biomedical and Pharmaceutical Applications. — *Nanomaterials*, 2015, **5**, 2054.
55. *Zhang Y., Sun Y., Yang X., Hilborn J., Heerschap A., Ossipov D.A.* Injectable in situ forming hybrid iron oxide-hyaluronic acid hydrogel for magnetic resonance imaging and drug delivery. — *Macromol Biosci.*, 2014, **14**, 1249.
56. *Lyubutin I.S., Starchikov S.S., Bukreeva T.V., Sulyanov S.N., Korotkov N.Y., Rumyantseva S.S., Marchenko I.V., Funtov K.O., Vasiliev A.L., Lysenko I.A.* In situ synthesis and characterization of magnetic nanoparticles in shells of biodegradable polyelectrolyte microcapsules. — *Materials Science and Engineering*. 2014, **45**, 225.
57. *Albuquerque P.B.S., Malafaia C.B.* Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. — *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, **107**, 615.
58. *Sevastianov V.I., Perova N.V., Shishatskaya E.I., Kalacheva G.S., Volova T.G.* Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. — *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2003, **14**, 1029.
59. *Artsis M.I., Bonartsev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Zaikov G.E.* Biodegradation and medical application of microbial poly(3-hydroxybutyrate). — *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 2010, **523**, 593.
60. *Иванцова Е.Л., Косенко Р.Ю., Иорданский А.Л., Роговина С.З., Прут Э.В., Филатова А.Г., Гумаргалиева К.З., Новикова С.П., Берлин А.А.* Структура и пролонгированный транспорт в системе биodeградируемый поли(3-гидроксibuтират) — лекарственное вещество. — *Высокомолек. соедин. Серия А*, 2012, **54**, 1.
61. *Карпова С.Г., Иорданский А.Л., Клешина Н.С., Попов А.А., Ломакин С.М., Шилкина Н.Г., Ребров А.В.* Изменение структурных параметров и молекулярной динамики смесевой композиции ПГБ с хитозаном. *Химическая физика*, 2013, **32**, 15.
62. *Olkhov A.A, Karpova S.G., Staroverova O.V., Kucherenko E.L., Ishchenko A.A., Iordanskii A.L.* Effect of external factors on the structure of ultrathin fibers of poly(3-hydroxybutyrate) and dipyrindamole. — *Fibre Chemistry*, 2017, **48**, 1.
63. *Karpova S.G., Olkhov A.A., Shilkina N.G., ..., Iordanskii A.L.* Investigation of biodegradable composites of poly(3-hydroxybutyrate) ultrathin fibers modified by a complex of iron(III) with tetraphenylporphyrin. — *Polymer Science, Series A*, 2017, **59**, 343.
64. *Michael R Hamblin.* Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. — *Current Opinion in Microbiology*, 2016, **33**, 67.
65. *Cinzia Spagnul, Lauren C. Turner, Ross W. Boyle.* Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications. — *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015, **150**, 11.

66. Ol'khov A. A., Pankova Yu. N., Kosenko R. Yu., Gol'dshtrakh M. A., Markin V. S., Iordanskii A. L. CR matrices for drugs based on PA PHB compositions controlled-release matrixes for drugs based on polyamide-polyhydroxybutyrate compositions. — Pharm. Chem. J., 2018, **52**, 47.
67. Olkhov A.A., Karpova S.G., Staroverova O.V., Kucherenko E.L., Ishchenko A.A., Iordanskii A.L. Effect of external factors on the structure of ultrathin fibers of poly(3-hydroxybutyrate) and dipyrnidamole. — Fibre Chemistry, 2016, **48** (4), 284.
68. Иорданский А., Ольхов А. Биоразлагаемые ультратонкие волокна для контроля доставки лекарств. — Palmarium. Academic Publishing. 2017.
69. Филатов Ю.Н. Электроформование волокнистых материалов. М. Нефть-газ, 2001.
70. Cho D., Zhmayev E., Joo Y.L. Structural studies of electrospun nylon 6 fibers from solution and melt. — Polymer, 2011, **52**, 4600.
71. Vasserman A.M., Buchachenko A.L., Kovarskii A.L., Neiman M.B. Study of molecular motion in polymers by the paramagnetic probe method. — Polymer Science U.S.S.R. 1976 **10**, 2238.
72. Liang Z., Freed J.H. An assessment of the applicability of multifrequency ESR to study the complex dynamics of biomolecules. — J. Phys. Chem. B, 1999, **103**, 6384.
73. Тимофеев В.П., Мишаурин А.Ю., Ткачев Я.В. — Биофизика. 2011, **56**, 420.
74. Arrieta M.P., López J, López D, Kenny J.M, Peponi L. Development of flexible materials based on plasticized electrospun PLA-PHB blends: structural, thermal, mechanical and disintegration properties. — J. Eur. Polym., 2015, **73**, 433.
75. Di Lorenzo M.L, Gazzano M, Righetti M.C. The role of the rigid amorphous fraction on cold crystallization of poly(3-hydroxybutyrate). — Macromolecules, 2012, **45**, 5684.
76. Kamaev P.P., Aliev I.I., Iordanskii A.L., Wasserman A.M. Molecular dynamics of the spin probes in dry and wet poly(3-hydroxybutyrate) films with different morphology. — Polymer. 2001, **42**, 515.
77. Ivanchev S. S., Ozerin A. N. Nanostructures in polymer systems. — Polymer Sci., ser. B, 2006, **48**, 213.
78. Huynh C. T., Kang S. W., Li Y., Kim B. S., Lee D. S. Controlled release of human growth hormone from a biodegradable pH/temperature-sensitive hydrogel system. — Soft Matter., 2011, **7**, 8984.
79. Hu C., Liu S., Zhang Y., Li B., Yang H., Fan C., Cui W. Long-term drug release from electrospun fibers for in vivo inflammation prevention in the prevention of peritendinous adhesions. — Acta Biomaterialia, 2013, **9**, 7381.
80. Padmanabhan J., Kyriakides T.R. Nanomaterials, inflammation, and tissue engineering. — Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2016, **7**, 355.
81. Keshavarz P., Ayatollahi S., Fathikalajahi J. Mathematical modeling of gas-liquid membrane contactors using random distribution of fibers. — Journal of Membrane Science, 2008, **325**, 98.
82. Petlin D.G., Amarah A.A., Tverdokhlebov S.I., Anissimov Y.G. A fiber distribution model for predicting drug release rates. — Journal of Controlled Release, 2017, **258**, 218.
83. Nakielski P., Kowalczyk T., Zembrzycki K., Kowalewski T.A. Experimental and numerical evaluation of drug release from nanofiber mats to brain tissue. — Journal of Biomedical Materials Research, Part B — Applied Biomaterials, 2015, **103**, 282.
84. Иорданский А.Л., Роговина С.З., Косенко Р.Ю., Иванцова Е.Л., Прут Э.В. Создание биоразлагаемой композиции полигидроксibuтират-хитозан-рифампицин для контролируемого транспорта биологически активных веществ. — ДАН, Физ. химия, 2010, **431**, 500.

85. *Sevim K., Pan J.* A model for hydrolytic degradation and erosion of biodegradable polymers. — *Acta Biomaterialia*, 2018, **66**, 192.
86. *Crank J.* The Mathematics of Diffusion. — Oxford: Clarendon Press, 1992.
87. *Mackie J.S., Meares P.* The diffusion of electrolytes in a cation-exchange resin membrane I. — Theoretical. Proc. R. Soc. A., 1995, **232**, 498.
88. *Bychkova A.V., Iordanskii A.L., Kovarski A.L., Sorokina O.N., Kosenko R.Yu., Markin V.S., Filatova A.G., Gumargalieva K.Z., Rogovina S.Z., Berlin A.A.* — *Nanotechn. Russ.*, 2015, **10**, 325.
89. *Чалых А.Е.* Диффузия в полимерных системах. — М., Химия, 1987.
90. *Siepmann J., Siepmann F.* Mathematical modeling of drug delivery. — *Int. J. Pharm.*, 2008, **364**, 328.
91. *Jämstorp B.E.* Diffusion Controlled Drug Release from Slurry Formed, Porous, Organic and Clay-derived Pellets. — Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 884 (Thesis), 2012. — 79 p.
92. *Huang X., Brazel C.S.* On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. — *Journal of Controlled Release*, 2001, **73**, 121.
93. *Bonartsev A.P., Lvshits V.A., Makhina T.A., Myshkina V.L., Bonartseva G.A., Iordanskii A.L.* Controlled release profiles of dipyridamole from biodegradable microspheres on the base of poly(3-hydroxybutyrate). |*Exp. Polym. Lett.*, 2007, **1**, 797.

## Глава 10

# Металл-полимерные нанокомпозиты: криохимический синтез, структура и эксплуатационные свойства

*Герасимов Г.Н.<sup>1</sup>, Громов В.Ф.<sup>1,2</sup>, Иким М.И.<sup>1</sup>, Трахтенберг Л.И.<sup>1,2</sup>*

Металлсодержащие нанокомпозиты на основе полимеров представляют большой интерес и интенсивно исследуются в связи с различными областями применения этих материалов, такими как хранение информации, химические сенсоры, катализ, а также ряд важных областей биологии и медицины. Существуют различные способы получения металлосодержащих полимеров, среди которых можно отметить химические реакции прекурсоров, в частности реакции солей металлов в полимерных растворах, обработку полимеров парами металлов или полимеризацию различных металл-мономерных систем [1–8]. В зависимости от природы металла и структуры полимера эти процессы приводят к получению полимерных цепей, содержащих металлоорганические звенья, металл-полимерных комплексов или металлических нанокластеров и наночастиц, физически связанных с полимерной матрицей.

В данной главе рассматривается синтез металлсодержащих нанокомпозитов с использованием паров металлов. В этом случае атомы или кластеры металлов не защищены комплексонами или сольватными оболочками и, следовательно, обладают высокой реакционной способностью. Существующие методы получения паров металлов позволяют широко варьировать различные металлы и органические лиганды. Такой метод синтеза позволяет получать новые металлоорганические соединения и комплексы, которые очень сложно, а во многих случаях невозможно синтезировать известными способами [9].

Особый интерес представляет криохимический твердофазный синтез металлосодержащих систем. С использованием криохимических процессов были получены метастабильные соединения, существование которых ранее только предполагалось [9]. Кроме того, в результате таких процессов образуются стабильные малые нанокластеры металлов квантового типа

<sup>1</sup> Институт химической физики им. Н.Н. Семенова, РАН

<sup>2</sup> Научно-исследовательский физико-химический институт им. Л.Я. Карпова

размером 2–3 нм, которые являются промежуточной формой вещества между изолированными атомами и металлом [10, 11]. Однако в обычных процессах твердофазного криохимического синтеза используются лишь низкомолекулярные матрицы, в которых получаемые начальные продукты такого синтеза могут сохраняться только при низких температурах, когда матрица достаточно жесткая, чтобы препятствовать трансформации или потере этих продуктов.

Таким образом, криохимический твердофазный синтез металл-полимерных композитных систем приобретает особое значение. В результате такого синтеза нанокластеры и наночастицы металлов, а также металлоорганические соединения, образующиеся при низких температурах, сохраняются в полимерной среде, что позволяет стабилизировать и исследовать синтезированные продукты в широком температурном диапазоне. Этот метод был впервые предложен и описан в [12]. При криохимическом синтезе металл-полимера в матрице стабилизируются относительно крупные нанокластеры металлического типа, характеризующиеся сплошной электронной полосой, а не кластеры квантового типа радиусом не более 2 нм с дискретными электронными уровнями [5]. Металлическим нанокластером обозначают обычно наночастицу металла, электронные характеристики которой зависят от ее размера. В частности, работа выхода электрона  $W(R)$  из сферической частицы растет с увеличением ее радиуса  $R$  как

$$W(R) = W_{\infty} + \frac{3}{8} \frac{e^2}{\epsilon R},$$

где  $W_{\infty}$  — работа выхода из массивного металла,  $\epsilon$  — диэлектрическая постоянная среды, в которой находится частица, и  $e$  — заряд электрона [5]. Зависимость  $W(R)$  от размера наночастиц становится существенной для частиц с  $R$  менее 5 нм и определяет процессы переноса электрона в системе таких наночастиц различного размера, что приводит к их взаимозаряджению. Этот эффект, как показано ниже, имеет большое значение для химических свойств металл-полимеров.

В данной главе обсуждаются магнитные и диэлектрические характеристики полученных материалов, а также их каталитическая активность и сенсорные свойства при детектировании газов в окружающей среде. Особое внимание обращено на применение этих материалов в биологии и медицине. Рассматриваются свойства полимерных нанокомпозитов, содержащих частицы металла (обычно медь или серебро) в нанодисперсном состоянии, которые отличаются высокой эффективностью антибактериального действия при отсутствии побочных отрицательных эффектов, характерных для других бактерицидных препаратов. Такие нанокомпозитные пленки служат защитой от патогенных бактерий. Кроме того, на

основе наноструктурированных композитных металл-полимерных пленок в настоящее время разработаны новые высокочувствительные спектральные методы выявления и анализа биомолекул, способствующие обнаружению в организме различных заболеваний.

Более подробное исследование процессов формирования нанокомпозитных металлсодержащих полимеров в зависимости от природы металла и характеристик полимерной матрицы позволит найти и детально охарактеризовать связь между структурой нанокомпозита и его свойствами. Тем самым, появится возможность найти пути синтеза металл-полимерных материалов с заранее определенными свойствами, в том числе с био- и медицинскими применениями.

## 10.1. Методы твердофазного криохимического синтеза

Металлосодержащие полимеры могут быть получены полимеризацией различных мономерных систем, включая металлоорганические соединения и совместные конденсаты металл-мономер, сопровождающейся осаждением полученных продуктов из газовой фазы. Совместные металл-мономерные конденсаты получают путем одновременного или поэтапного осаждения паров металла и мономера на пластинах подложки при низких температурах (обычно 77 К). Полимеризация может протекать различными путями. Некоторые металл-мономерные системы полимеризуются во время совместной конденсации (Ge и Sn с ацетиленом [13], Mg с CN-замещенным п-ксилиленом [14]) скорее всего за счет тепла, выделяемого при конденсации. В работах [15-17] соконденсаты металлов (Pd, Ag, Au и др.) и виниловых мономеров, полученные при 77 К, нагревали до температуры плавления. Далее эти металлсодержащие коллоидные системы подвергали полимеризации в жидком состоянии под действием радикальных инициаторов.

Данный метод позволяет синтезировать металл-полимерные композиты, содержащие частицы довольно большого размера (около 160 нм), с очень малой концентрацией металлов (0,01–1 мас.%) [15]. Металл-полимерные материалы с высоким содержанием металлов могут быть получены при полимеризации металл-мономерных конденсатов. Первые исследования в этой области были проведены в 1959 г. на примере находящегося в стеклообразном состоянии соконденсата Mg с акрилонитрилом. Полимеризацию проводили при размягчении стекла под действием активных центров, образуемых в результате переноса электрона от Mg к акрилонитрилу [18]. Состояние металла в полученной полимерной системе не было охарактеризовано.



Криохимический синтез основан на низкотемпературной твердофазной полимеризации в условиях замороженной молекулярной подвижности в реакционной системе. Показано, что ряд мономеров, таких как акрилонитрил [19], формальдегид [20–22] или *p*-ксилилен и его производные [23, 24], полимеризуются в твердом состоянии под действием  $\gamma$ - или ультрафиолетового излучения при 77 К и даже при более низкой температуре, близкой к температуре жидкого гелия [19, 21]. Предполагается, что такая полимеризация обусловлена специфической надмолекулярной организацией твердых мономеров, содержащих молекулярные агрегаты, которые являются прекурсорами полимерных цепей [25]. В таких агрегатах механическое возмущение, возникающее при индуцированной излучением генерации цепей, в определенных условиях может приводить к последующему безактивационному росту полимерной цепи [26–28].

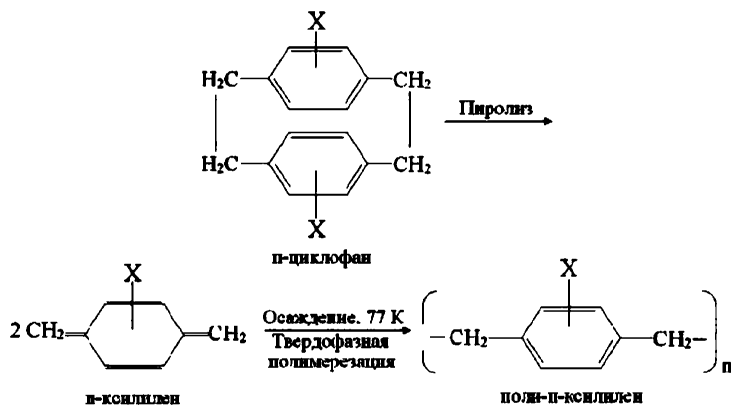


Схема. 10.1. Синтез и полимеризация *p*-ксилиленовых мономеров

Наиболее подходящими мономерами для криохимического синтеза металлсодержащих полимеров являются производные *p*-ксилилена (PX), содержащие различные заместители, поскольку они количественно полимеризуются при низких температурах без применения каких-либо посторонних соединений, в частности, инициаторов или сенсibilизаторов. Изменяя природу заместителей, можно в довольно широком диапазоне модифицировать физико-химические свойства полимерной матрицы. PX-соединения получают в результате пиролиза соответствующих [2,2]-парацycлофанов без образования детектируемых побочных продуктов [29]. Получение и полимеризация PX-соединений представлены на схеме 10.1.

Обычно осаждение PX-мономеров проводят на различных субстратах при комнатной температуре (ниже 30 °C). В этих условиях на поверхности субстрата в процессе осаждения таких мономеров происходит их

количественное превращение в поли-*p*-ксилилены (РРХ). При более высоких температурах РРХ-полимеры не образуются, возможно, формируются низкомолекулярные продукты, которые не стабилизируются на поверхности субстрата.

При криохимическом синтезе РРХ-полимеров исходные мономеры осаждаются на субстрат, охлажденный до 77 К, в результате чего на поверхности субстрата образуется твердая пленка РХ-мономера. Самопроизвольная термическая полимеризация осажденного мономера протекает при температурах около 170 К, но при УФ-излучении РХ полностью полимеризуется даже при температурах, близких к 77 К [22–24]. Как указано в работе [23], твердый РХ, скорее всего, содержит прекурсоры полимерной цепи в виде мономерных агрегатов, превращающихся в полимерные цепи в результате довольно небольшого вращательного смещения молекул без их перемещения. Предполагаемая картина твердофазной полимеризации *p*-ксилиленовых мономеров представлена на рис. 10.1.

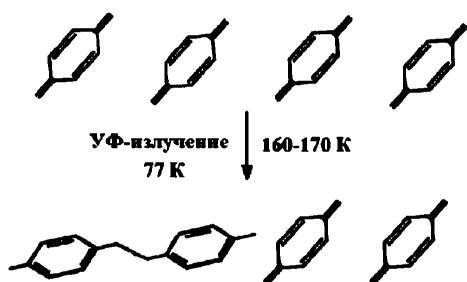


Рис. 10.1. Предполагаемая надмолекулярная структура твердого РХ и схема полимеризации РХ

Металлсодержащие поли-*p*-ксилилены синтезировали, используя РХ-мономеры с металлорганическими заместителями или соконденсаты РХ-мономеров с металлами. В последнем случае пары этих мономеров смешивали на выходе из пиролитической трубки с парами металлов, полученных возгонкой соответствующего металла. В зависимости от летучести металла такая возгонка проводилась при нагревании металла в специальной трубке, снабженной нагревателем или под действием электронного (или ионного) пучка [30]. Смесь РХ-мономера с парами металла осаждали на подложку оптического криостата, охлажденную до 77 К, а затем полимеризовали термически или под действием УФ-излучения.

## 10.2. Структура металл-полимеров, полученных криохимическим методом

В зависимости от структуры металла и мономера криохимическая полимеризация металл-мономерных систем из паровой фазы позволяет получать металлсодержащие полимеры различной структуры. Полимеры, содержащие металл-органические группы или металл-полимерные комплексы, могут быть получены из предварительно синтезированного металлорганического мономера или мономера и металла, химически взаимодействующих друг с другом во время осаждения паров. В последнем случае особенно привлекательными являются п-ксилиленовые мономеры, что связано с их высокой реакционной способностью и способностью к комплексообразованию с металлами, обусловленной низким уровнем  $\pi$ -орбиталей этих мономеров. В отсутствие химических или координационных связей между металлом и мономером криохимический синтез путем осаждения из паровой фазы дает металлические кластеры, физически встроенные в полимерную матрицу. Устойчивость низкотемпературных продуктов такого синтеза, а также их трансформация в результате вторичных тепловых процессов в матрице зависят от структуры и физико-химических свойств матрицы.

Производные поли-п-ксилилена с атомами Ge и Sn, ковалентно связанными с полимерными цепями, были синтезированы в результате полимеризации по схеме 10.1 PX мономеров, полученных пиролизом мостиковых [2,2]-п-циклофанов с Ge- и Sn-органическими группами [31, 32]. Низкотемпературная твердофазная полимеризация полученного мономерного композита приводит к кристаллическим блок-сополимерам, структура которых соответствует структуре микрокристаллического мономера. В то же время полимеризация мономеров при 283 К в условиях высокой молекулярной подвижности приводит к аморфному блочному сополимеру или жидким олигомерам [32].

Полимеры с металлорганическими звеньями, входящими в полимерную структуру, могут быть также синтезированы низкотемпературной твердофазной полимеризацией металл-мономерных соконденсатов, в которых атомы или кластеры металлов образуют промежуточные химические или координационные связи с молекулами мономера и активными центрами полимеризации. В частности, полимеризация ацетилена в результате совместного осаждения его паров с парами Ge или Sn при 77 К приводит к формированию полиацетилена с атомами Ge или Sn, включенными в систему сопряженных  $\pi$ -электронных связей [13].

Структура и полимеризация осажденной из паровой фазы мономерной системы РХ-Мг изучены в работах [33–38]. При этом образуется РРХ с Мг-органическими звеньями в полимерных цепях, стабильность которых зависит от содержания атомов металла ( $X_{at}$ ) в полимере. При  $X_{at} \leq 20$  ат.% магнийорганические звенья в РРХ в инертной атмосфере разрушаются при комнатной температуре, тогда как при  $X_{at} > 40$  ат.% они стабильны вследствие взаимодействия между магнийорганическими звеньями РРХ-цепей [39, 40].

Осаждение паров РХ с  $C \equiv N$ -заместителем в хиноидном кольце (CN-РХ) вместе с парами Мг при 77 К приводит к полимеризации этого мономера с образованием соответствующего замещенного РРХ (CN-РРХ). Однако при осаждении паров Мг и CN-РХ при 290 К, сопровождающемся полимеризацией, образуется только CN-РРХ, содержащий  $\pi$ -комплексы между Мг и нитрильными группами полимера [14].

Совместная конденсация Мп с РХ при 77 К дает комплексы двух типов: комплексы с переносом заряда, аналогичные комплексам Мг-РХ, и d- $\pi$ -комплексы РХ, включающие d-орбитали Мп и  $\pi$ -орбитали РХ [35, 41]. Полимеризация такой системы при 77К под действием облучения сопровождается разрушением d- $\pi$ -комплексов и превращением комплексов с переносом заряда в марганецорганические РРХ-звенья, подобные магнийорганическим звеньям РРХ [35, 41]. Эти звенья разлагаются при комнатной температуре даже в вакууме, образуя кластеры Мп-атомов. Кластеры, возникающие при разложении марганецорганических звеньев и комплексов, приводят к образованию Мп-нанокристаллов внутри РРХ-матрицы.

Как показано выше, внедрение в полимерные матрицы металла с нулевой валентностью или неорганических металлсодержащих соединений (наибольший интерес представляют полупроводниковые соединения, в частности оксиды металлов, поскольку электронная структура полупроводниковых частиц сильно зависит от их размера) может быть достигнуто в результате разложения металлоорганических полимерных структур, полученных криохимическим методом. Однако в большинстве случаев металл не вступает в химическую реакцию с мономером, поэтому физически внедренные в полимерную матрицу металлические кластеры и нанокристаллы образуются непосредственно в процессе твердофазной полимеризации мономера, осажденного из газовой фазы [4, 24, 42, 43]. Первичные продукты криохимического синтеза, включающие металлы или полупроводники, представляют собой небольшие атомные или молекулярные кластеры. При нагревании такого композита эти частицы объединяются в нанокристаллы металла или полупроводника. Температурный диапазон, при котором протекает этот процесс, зависит от структуры полимерной матрицы. Стабилизирующие свойства РРХ-матрицы могут быть увеличены настолько,

что небольшие атомные и молекулярные кластеры остаются неизменными в этой матрице в течение длительного времени даже при комнатной температуре. Такая ситуация может быть достигнута в результате введения в цепи поли-*n*-ксилилена соответствующих заместителей.

Металлические частицы, кластеры или нанокристаллы в композитных пленках стабилизируются без образования каких-либо специфических координационных связей между поверхностью частиц и полимером или без каких-либо специальных стабилизирующих соединений. Такие частицы обладают лишь слабым (кулоновским и ван-дер-ваальсовым) взаимодействием с окружающей средой, и их размер обусловлен главным образом жесткостью матрицы, внутри которой образуются частицы. Это является основным преимуществом криохимической твердофазной технологии по сравнению с другими традиционными методами синтеза.

Рассмотренный метод позволяет выращивать частицы в широком диапазоне размеров, включая мелкие кластеры, в неполярных, а также в гидрофобных полимерных матрицах. Концентрация наночастиц также может широко варьироваться вплоть до высоких значений, обеспечивая полезные свойства, возникающие в результате взаимодействия наночастиц. Структура и свойства нанокompозита определяются объемом, занимаемым металлическими частицами, т. е. объемным содержанием металла ( $X_V$ ). Поэтому этот параметр в основном используется далее при описании композитов. Между этим параметром и атомным содержанием металла  $X_{at}$  существует соотношение  $X_V = \rho_P X_{at} / [\rho_P X_{at} + \rho_M (1 - X_{at}) M_P / M_M]$ , где  $\rho_P$  и  $\rho_M$  — плотность полимера и металла соответственно, а  $M_P$  — молекулярная масса полимера и  $M_M$  — атомный вес металла. Низкотемпературный синтез на основе паров позволяет получать композиты с  $X_V$  до 50%.

Совместная конденсация паров золота и диацетиленового мономера при 77 К и последующий прогрев конденсата приводит к получению полимера с сопряженными  $\pi$ -связями. Этот полимер содержит нанокластеры золота и обладает необычными оптическими свойствами [44]. Металл-полимерные композиты, синтезированные термической полимеризацией низкотемпературных соконденсатов акриловой кислоты или метилакрилата с некоторыми металлами, описаны в работе [45]. Полимерные композиты содержали частицы металла размером 5–15 нм.

Криохимический синтез систем Ag-PPX и их структура изучены в ряде работ [24, 33, 35, 36, 43]. Одновременное осаждение из паровой фазы PX, CN-PX и Cl-замещенного PX (Cl-PX) вместе с Ag при 77 К не приводит к комплексообразованию или образованию каких-либо металлоорганических соединений [24, 35, 43]. В случае PX и Cl-PX такое осаждение протекает без полимеризации. Совместное осаждение CN-PX с Ag сопро-

вождается частичной полимеризацией мономера. Начальные конденсаты при 77 К содержат небольшое количество нанокристаллов серебра, которые могут быть обнаружены и охарактеризованы с помощью UV-Vis-спектроскопии, поскольку в спектре таких кристаллов имеется специфическая полоса поглощения поверхностных электронных плазмонов около 430 нм [3] (рис. 10.2 и 10.3).

УФ-облучение этих конденсатов при 77 К приводит к полной конверсии мономеров в соответствующие полимеры (PPX, Cl-PPX и CN-PPX). Однако интенсивность ( $D_{cr}$ ), максимальное положение ( $\lambda_{max}$ ) и полуширина ( $\Delta_{1/2}$ ) полосы плазмона нанокристаллов практически не изменяются в ходе криополимеризации (рис. 10.2 и 10.3, табл. 10.1).

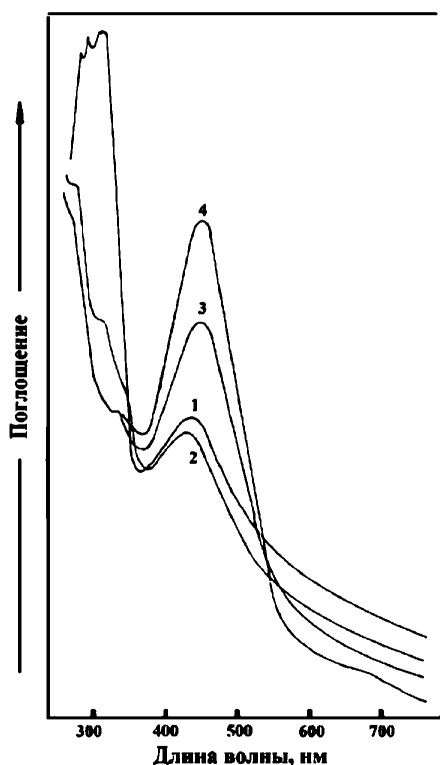


Рис. 10.2. UV-Vis спектр твердых пленок при 80 К: пленки получены совместной конденсацией Ag и ClPPX при 80 К (1); эти же пленки после УФ-полимеризации при 80 К (2); заполимеризованные пленки после отжига при 293 К (3) и 373 К (4)

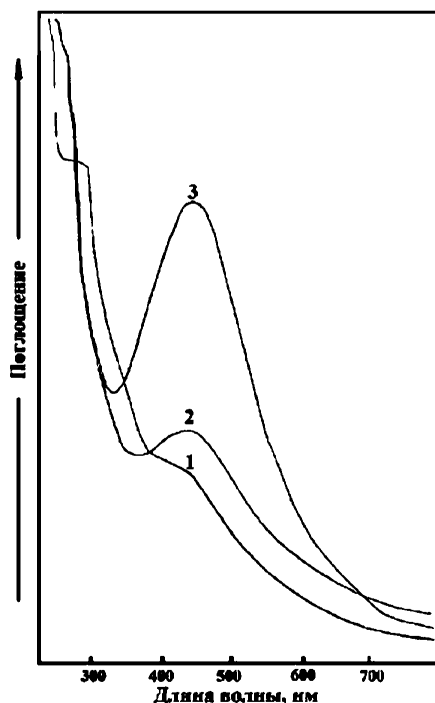


Рис. 10.3. UV-Vis спектр твердых пленок при 80 К: (1) пленки получены совместной конденсацией Ag и CNPPX at 80 К; (2) эти же пленки после УФ-полимеризации при 80 К и отжига при 293 К; (3) заполимеризованные пленки после отжига при 373 К

**Таблица 10.1.** Спектральные характеристики и содержание Ag нанокристаллов, образующихся в твердой системе в процессе твердофазного синтеза Ag-PPX нанокompозита

Система	$\lambda_{max}$ (nm)	$\Delta_{1/2}$ (nm)	$D_{cr}$ (при $\lambda_{max}$ )	Содержание Ag нано-кристаллов, ат. %
PX-Ag при 77 К	430	93	0,24	4,2
PPX-Ag при 77 К	430	93	0,24	4,2
PPX-Ag при 298 К	435	96	0,28	5,0
PPX-Ag при 320 К	443	98	1,10	16,3
PPX-Ag при 373 К	443	98	1,22	18,0

Поскольку величина  $D_{cr}$  пропорциональна содержанию Ag-нанокристаллов, а величина  $\Delta_{1/2}$  обратно пропорциональна их среднему размеру ( $\bar{d}$ ) [3, 46], можно сделать вывод, что состояние и количество нанокристаллов Ag не влияет на криополимеризацию [24, 35, 43]. Резкий рост  $D_{cr}$  при нагреве полученных металл-полимерных пленок указывает на то, что основная часть Ag при 77 К находится в виде небольших некристаллических кластеров  $Ag_n$ , которые в результате термической релаксации в полимерной матрице агрегируют с образованием нанокристаллов. В UV-Vis спектрах пленок PPX на фоне поглощения PPX можно наблюдать только полосы поглощения  $Ag_n$  с  $n > 15$ , которые должны находиться в «открытом» диапазоне спектра PPX при  $\lambda > 320$  нм [11]. Поскольку в этом спектральном диапазоне нет других полос поглощения, кроме полосы поглощения нанокристаллов Ag, можно сделать вывод, что кластеры, стабилизированные в полученных пленках, содержат менее 15 атомов серебра [24, 43].

Твердая полимерная матрица препятствует агрегации криохимически полученных Ag-кластеров, так что значительная часть Ag в полученных системах Ag-PPX остается в некристаллической форме при комнатной и даже более высоких температурах. Весь Ag, введенный таким образом в исследованные PPX-матрицы, преобразуется в нанокристаллы после отжига при 373 К [24, 35, 43]. Поэтому отношение  $D_{cr}$  в спектре исследуемой пленки к  $(D_{cr})_0$  в спектре той же пленки, отожженной при 373 К, характеризует степень кристаллизации кластеров (табл. 10.1). Спектральные данные показывают, при нагревании композита от 77 до 293 К положение плазмонной полосы, относящейся к нанокристаллам Ag в пленках Ag-PPX, сдвигается в длинноволновый диапазон и затем не изменяется при дальнейшем нагревании от 293 до 373 К (табл. 10.1). Тот же эффект наблюдался для пленок Ag-Cl-PPX [24].

Следует отметить, что в отличие от нанокристаллов Ag в нанокompозитах Ag-PPX с  $\lambda_{max}$  плазмонной полосы в диапазоне 430 ÷ 445 нм нанокри-

сталлы, полученные восстановлением ионов  $\text{Ag}^+$ , находящихся в водном растворе поли(*N*-винилпирролидона) и связанных с молекулами этого полимера, имеют плазмонную полосу с  $\lambda_{\text{max}}$  при 410 нм [49]. UV-Vis спектр нанокристаллов зависит от их размера и формы, а также от матрицы, в которую внедрены эти кристаллы [49]. Плазмонная полоса нанокристаллов Ag в композите и в сферической металлической наночастице с гладкой идеальной поверхностью [50, 51] совпадает.

Нанокристаллы такого типа образуются в различных жидких средах, таких как органический раствор [3, 47] или размягченное квазижидкое стекло [48, 49], в которых отсутствуют стерические препятствия для роста равновесных кристаллов без поверхностных дефектов. В то же время наличие барьеров, препятствующих агрегации кластеров или атомов в металлические нанокристаллы в твердой системе, приводит к образованию кристаллов с поверхностными структурными дефектами. Это в определенной степени «размывает» границы металлического нанокристалла, что приводит к сдвигу длины волны плазменного резонанса в красную область [50]. Размораживание полимерной матрицы и соответствующее изменение поверхности раздела между металлом и диэлектриком могут объяснить дальнейший сдвиг максимума поглощения для поверхностных электронных плазмонов в длинноволновую область.

Агрегация кластеров в нанокристаллах зависит от содержания металла. В полученных пленках Ag-Cl-PPX доля металла, стабилизированного в форме кластеров при 293 К, уменьшается от 90 до 20% при увеличении общего содержания металла от 0,25 до 2 об.% [43]. На стабильность кластеров в значительной степени влияет также структура полимерной матрицы [35, 43]. Сравнение спектров на рис. 10.2 и 10.3 показывает, что в криохимически синтезированных пленках Ag-CN-PPX стабильность кластеров Ag намного выше, чем в аналогичных пленках Ag-Cl-PPX. Данные по величине отношения  $D_{cr}/(D_{cr})_0$  (см. выше) в спектрах различных пленок показывают, что в криохимически синтезированных пленках Ag-CN-PPX, нагретых до температуры окружающей среды, до 70% от общего количества внедренного в матрицу Ag (при его общем количестве около 2 об.%) стабилизируется в виде малых некристаллических кластеров [43]. Аналогичный результат был получен для Ag-PPX (табл. 10.1) [35]. Следует отметить, что в Ag-Cl-PPX, содержащем такое же общее количество Ag, доля Ag-кластеров при 295 К составляет всего около 20% [24, 43].

Достаточно высокая стабильность кластеров Ag в матрице PPX может быть объяснена особенностями аморфной фазы PPX, в которой в основном и локализованы кластеры. Из-за отсутствия заместителей в PPX-цепях эта фаза, по-видимому, отличается от аналогичной фазы замещенного PPX бо-



лее высокой плотностью и, следовательно, в большей степени препятствует агрегации кластеров.

В CN-PPX (по сравнению с Cl-PPX) существует, вероятно, специфическое взаимодействие между электронодонорными Ag-кластерами и электрофильными CN-группами полимерной среды, что обеспечивает высокую стабильность кластеров. Средний размер нанокристаллов ( $\bar{d}$ ), оцененный из  $\Delta_{1/2}$  плазмонной полосы поверхности нанокристалла в спектрах Ag-Cl-PPX, составляет около 45 Å [43]. Спектральные данные свидетельствуют о том, что средний размер нанокристаллов в криохимически полученном Ag-PPX [35] практически такой же. Расчет с использованием величины полуширины пика (110) Ag-нанокристаллов в рентгеновской дифрактограмме пленки Ag-Cl-PPX, полученной полимеризацией соконденсата Ag-Cl-PX при 80 К с последующим отжигом при 293 К, дает значение ( $\bar{d}$ ) близкое к 50 Å (рис. 10.4) [24].

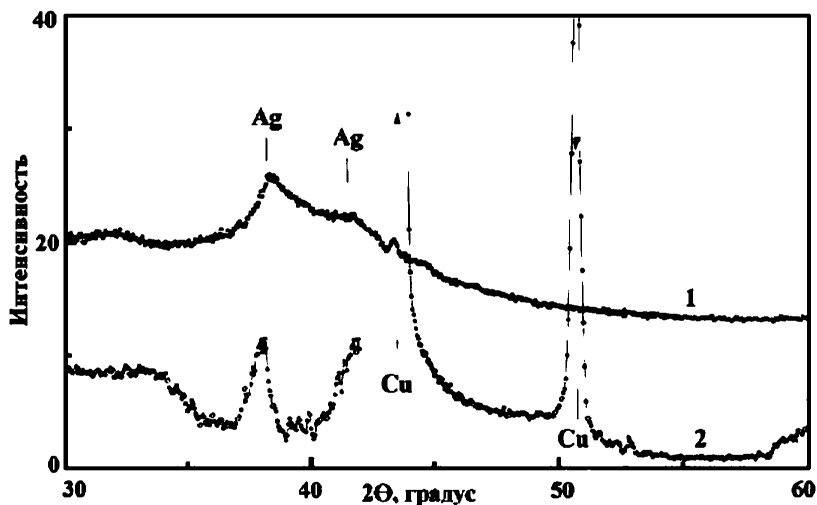


Рис. 10.4. Рентгенограммы систем Ag-Cl-PPX: (1) соконденсат Ag-Cl-PX, полимеризованный при 80 К и отожженный при 293 К; (2) послойное нанесение of Cl-PX and Ag с последующими полимеризацией при 80 К и отжигом при 293 К. В качестве стандарта использовали пики медной фольги

Для сравнения на рис. 10.4 показана также дифрактограмма модельной системы, образующейся в результате послойного осаждения мономера Cl-PX и Ag при 77 К и последующей фотоиницированной полимеризации при той же температуре и отжиге при 293 К. Хотя величины межфазной энергии на границе Ag/полимерная матрица в слоистой системе и в полимеризованном соконденсате одинаковы, значение ( $\bar{d}$ ) в слоистой системе близко к 120 Å [24]. Таким образом, средний размер Ag-нанокристаллов

в соконденсате определяется главным образом стерическими ограничениями, препятствующими росту кристаллов внутри твердой матрицы.

Ag-содержащий PPX был исследован методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Снимки ТЭМ демонстрируют глобулярные частицы размером от 20 до 120 Å, довольно гомогенно распределенные в полимерной матрице [35]. Гистограмма распределения частиц по размерам (рис. 10.5) показывает, что основной размер частиц составляет от 40 до 60 Å, что хорошо согласуется с результатами рентгеновских и спектральных измерений для Ag-Cl-PPX. Подобные гистограммы были определены этим же методом для Pb (рис. 10.6), Zn и Cd-содержащих наноккомпозитных PPX-пленок, полученных криохимическим синтезом с осаждением из паровой фазы [51]. Значение ( $\bar{d}$ ) нанокристаллов металла в этих пленках составляет около 50 Å. Такой же приблизительный размер ( $\bar{d}$ ) (около 45 Å) был оценен по величине  $\Delta_{1/2}$  пика дифракции рентгеновских лучей для полупроводниковых PbS-нанокристаллов в наноккомпозите PbS-PPX, полученном осаждением из паровой фазы PX вместе с PbS при 77 K и последующим нагреванием образовавшейся мономерной системы до 293 K [52].

Таким образом, средний размер кристаллов металла или полупроводника в криохимически приготовленных наноккомпозитах PPX почти не зависит от природы таких кристаллов, но определяется полимерной матрицей. В частности, данные о ширине полосы плазмона нанокристаллов [43] (см. рис. 10.2 и 10.3) указывают на то, что ( $\bar{d}$ ) нанокристаллов, образованных из Ag-кластеров в CN-PPX, примерно в полтора раза меньше, чем у аналогичных нанокристаллов в PPX и Cl-PPX.

Согласно спектральным данным изменение содержания Ag в криохимически синтезированных пленках Ag-PPX и Ag-Cl-PPX от 0,3 до 2 об.% (т. е. от 4 до 20 ат.%) не влияет на размер нанокристаллов Ag, образованных в результате агрегации кластеров [35, 43]. Такой же результат был получен для пленок Pb-PPX с содержанием Pb от 0,01 до 1 об.% [51]. В отличие от других аналогичных систем наноккомпозиты PbS-PPX были изучены при более высоком содержании PbS в диапазоне от 4,7 до 10,2 об.%. И в этом случае согласно рентгеновским данным ( $\bar{d}$ ) PbS-нанокристаллов также не зависит от содержания PbS [52]. Таким образом, можно сделать вывод, что независимость среднего размера нанокристалла от содержания металла или полупроводника является общей особенностью наноккомпозитов, полученных в результате твердофазного синтеза.

Рост наночастиц в процессе полимеризации рассмотрен в работах [53, 54]. При моделировании этого процесса предполагалось протекание мгновенного зародышеобразования с последующим осаждением атомов металла на поверхность растущего зерна в результате диффузии внедренных в полимер атомов. При моделировании учитывалось, что в процессе по-

лимеризации коэффициент диффузии атомов металла в полимерной системе заметно уменьшается с увеличением конверсии мономера в полимер в связи с уменьшением свободного объема системы [53]. Модель позволяет установить безразмерные параметры, определяющие образование нанокompозитных пленок и их структуру при классических процессах полимеризации [55].

При твердофазном криохимическом синтезе процессы полимеризации и образования нанокристаллов происходят раздельно: при низкотемпературной полимеризации агрегация атомов металлов и мелких металлических кластеров замораживается и протекает лишь после полимеризации при нагревании полученной полимерной системы. Структура полимера, получаемого при низкотемпературной твердофазной полимеризации, соответствует структуре нанесенной на подложку в процессе осаждения из паровой фазы микрогетерогенной мономерной системы и содержит глубокие и мелкие ловушки. Можно предположить, что растущие кристаллические зерна образуются из металлических кластеров, иммобилизованных в глубоких ловушках. Атомы и кластеры металлов, расположенные в мелких ловушках, удаляются из них в результате процессов термической релаксации и объединяются с растущими кристаллами.

Связь между глубокими и мелкими ловушками определяется морфологией и свойствами полимерного композита. В этом случае концентрация растущих зерен пропорциональна содержанию металла, поэтому средний размер нанокристаллов, т. е. среднее количество металла на одно растущее зерно, не зависит от содержания металла. С этой точки зрения тот факт, что кристаллизация в CN-PPX дает Ag-нанокристаллы, размер которых меньше, чем у кристаллов, образующихся в других PPX-матрицах, можно объяснить увеличением относительной доли специфических глубоких ловушек для кластеров Ag в полимерной матрице с электроноакцепторными CN-группами. Это приводит к увеличению относительной доли кристаллических зародышей в общем количестве кластеров Ag и, как следствие, к уменьшению среднего размера нанокристаллов.

Свойства полимерного композита, содержащего металлические или полупроводниковые нанокристаллы, зависят не только от среднего размера нанокристаллов, но и от распределения этих нанокристаллов по размерам. Для криохимически синтезированных нанокompозитных пленок PbS-PPX была исследована зависимость распределения кристаллитов по размерам от содержания PbS в диапазоне от 4,7 до 10,2 об.%. Кривые распределения, полученные при анализе данных широкоугольного рентгеновского рассеяния (WAXS), представлены на рис. 10.7 [52, 56, 57]. Видно, что распределение не очень широкое и находится в пределах от 20 до 150 Å; основная часть кристаллитов PbS имеет размер намного меньше 100 Å.

Кривая для наноккомпозита с 4,7 об.% PbS аналогична определенной методом ТЕМ гистограмме распределения по размерам кристаллитов для наноккомпозитных пленок Ag-PPX и Pb-PPX с низким содержанием металлов (рис. 10.5 и 10.6). Это означает, что, как и средний размер кристаллов, распределение по размерам не зависит от природы металла или полупроводника, включенного в полимер в процессе криохимического синтеза. Исключением являются системы, характеризующиеся специфическим взаимодействием между кластерами металлов, которые являются предшественниками нанокристаллов, и полимером. Примером такого исключения является система Ag-CN-PPX (см. выше).

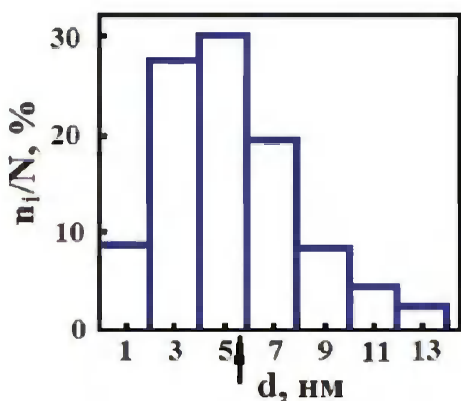


Рис. 10.5. Гистограмма распределения по размерам нанокристаллов Ag в пленках PPX-Ag.  $n_i/N$  — доля нанокристаллов определенного размера. Стрелкой отмечен максимум распределения по размерам

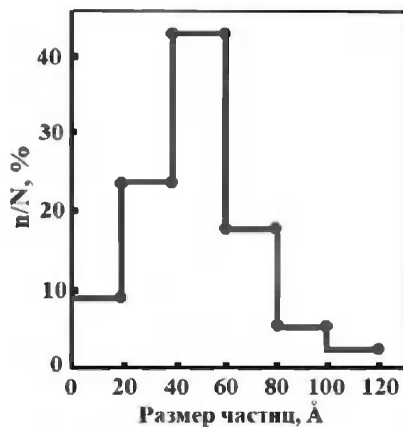


Рис. 10.6. Гистограмма распределения PPH-Pb пленок по размерам

Наноккомпозит PbS-PPX, содержащий 4,7 об.% PbS, исследовался также методом малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS), который характеризует различные включения PbS в матрице PPX независимо от их внутренней структуры. Распределение по размерам включений PbS, рассчитанное по данным SAXS, аналогично распределению по размерам кристаллитов, определенному методом WAXS (рис. 10.7). Этот результат означает, что наночастицы PbS не агрегируются в матрице, а распределены, в основном, в виде небольших кристаллитов [52].

Расположение нанокристаллов в композитных пленках определяется надмолекулярной структурой PPX. Как следует из рис. 10.8, кривая SAXS при относительно небольшом содержании PbS (4,7 об.%) имеет широкий максимум, который определяет некоторый порядок расположения нанокристаллов PbS. В этом случае PPX-матрица сохраняет еще полукристал-

лическую структуру [52]. В такой матрице зарождение и последующий рост неорганических нанокристаллов происходит в основном в аморфных областях, где имеется достаточно свободного объема. Наблюдаемый максимум SAXS соответствует средней периодичности между нанокристаллическими частицами PbS в различных аморфных областях, разделенных ламелярными кристаллитами PPX. Характерный параметр этой надмолекулярной периодичности составляет около 250 Å, что приблизительно совпадает с толщиной ламелей PPX [52].

Рис. 10.7. Распределение по размерам кристаллитов PbS в зависимости от концентрации PbS в PPX-PbS композите

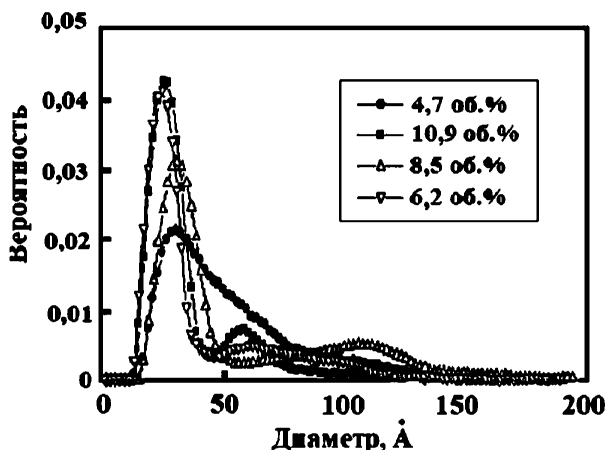
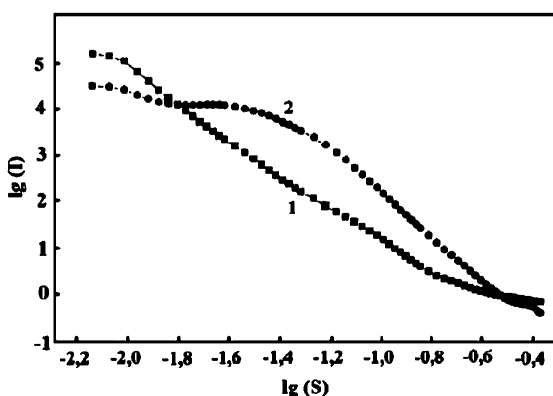


Рис. 10.8. Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей PPX-PbS композитной пленкой, содержащей 4,7 об.% of PbS (1), и PPX пленкой (2)



Увеличение концентрации PbS приводит к изменению формы кривой распределения кристаллов по размеру, которая становится бимодальной. Показано, что такое бимодальное распределение кристаллов по размерам наблюдается не только в образцах PPX-PbS, но и в PPX, содержащих

нанокристаллы Ag. В отличие от других аналогичных систем композиты, полученные с помощью криохимического твердофазного синтеза, демонстрируют заметное увеличение содержания мелких кристаллов при повышении количества внедренного в полимер неорганического компонента (металла или полупроводника). На рис. 10.7 показано, что доля PbS-кристаллитов размером приблизительно 30 Å увеличивается от 20 до 80% при увеличении общего содержания PbS от 4,7 до 10 об.%. В то же время высокая концентрация PbS способствует образованию довольно больших кристаллов в диапазоне размеров 70 Å. По этой причине средний размер кристалла, определенный по полуширине линии дифракции рентгеновских лучей, существенно не изменяется и остается в диапазоне 40–50 Å.

Причины такого необычного изменения кривой распределения размеров кристалла с увеличением содержания металла в настоящее время не ясны. Увеличение содержания металлических или полупроводниковых включений снижает кристалличность полимерной матрицы и размер полимерного кристалла. Считается, что этот процесс сопровождается образованием большого количества локальных дефектных участков, где происходит зарождение и рост зерен неорганического компонента в полимерной матрице.

Процесс формирования таких зерен при содержании в системе большой концентрации неорганического компонента увеличивает ее жесткость, что замедляет рост кристаллов вследствие реорганизации системы и перераспределения свободного объема. Поэтому основная часть кристаллов имеет небольшие размеры. В то же время увеличение содержания металла (или полупроводника) может привести к образованию пространственных дефектов с высоким свободным объемом, где может происходить коагуляция нанокристаллов, в результате которой образуются довольно большие кристаллические кластеры. Ясно, что такие дефекты возникают при деформациях, сопровождающих зародышеобразование при высоком содержании неорганического компонента.

### 10.3. Физико-химические свойства металл-полимерных материалов

Твердофазная полимеризация пленок, осажденных из газовой фазы, позволяет получать композиты с высоким (близким к порогу перколяции) содержанием стабильных частиц металла различного размера, внедренных в разнообразные полимерные матрицы. Синтезированные таким методом нанокомпозиты с высоким содержанием металла могут обладать ценными свойствами в различных областях применения. Во-первых, про-

являются эффекты, связанные с локализацией изолированных частиц, например, плотность записи магнитных данных в композитах, содержащих ферромагнитные монодоменные наночастицы, резко возрастает. Кроме того, в нанокompозитах с высоким содержанием металлов следует учитывать взаимодействие между наночастицами, которое определяет кооперативное поведение системы металлических наночастиц, иммобилизованных в полимерной матрице. Это взаимодействие приводит, в основном, к переносу заряда между наночастицами, который, в частности, существенно влияет на электрофизические и диэлектрические свойства, а также на каталитическую активность металл-полимерных материалов, синтезированных методом осаждения из газовой фазы [58, 59].

Особое внимание уделено использованию наноструктурированных металл-полимеров в медицине. Эти материалы играют важную роль в качестве антибактериальных материалов для защиты от патогенных бактерий. Кроме того, наноструктурированные металл-полимерные пленки были использованы для выявления и анализа биомолекул, характеризующих в ряде случаев различные заболевания.

## Проводимость и фотопроводимости

Металл-полимерные системы, получаемые в результате криохимической полимеризации пленок, осажденных из газовой фазы, содержат стабилизированные неметаллические кластеры атомов металлов и металлические нанокристаллы.

Рассматривая процессы проводимости, следует иметь в виду, что в этих процессах участвуют только нанокристаллы металлов. Данные об Ag-содержащих РРХ композитах [43] свидетельствуют о том, что относительная доля металла, стабилизированного в виде кластеров при температуре окружающей среды, резко уменьшается с увеличением общего содержания металла в системе даже в диапазоне 0–2 об.%. Поэтому при измерениях проводимости, которые проводились при значительно более высоких концентрациях металлов, было принято, что в первом приближении весь металл находится в виде нанокристаллов.

Когда металлические частицы сформированы в полимере таким образом, что взаимодействием между ними можно пренебречь, проводимость композита определяется проводимостью полимерной матрицы. Это относится к композитам металл-РРХ, полученным методом криохимической полимеризации пленок, осажденных из газовой фазы, если такие композиты содержат нанокристаллы металлов или полупроводников в количествах менее  $4 \div 5$  об.% [30]. Проводимость таких композитов подчиняется клас-

сическому омическому соотношению между током и напряжением и Аррениусовской зависимости от температуры. При более высоком содержании металлов механизм проводимости в синтезированных композитных пленках изменяется в результате взаимодействия между частицами. В пленках PPX, содержащих от 5 до 10 об. % Pb-наночастиц, зависимость тока  $I$  от напряжения  $U$  выглядит как  $\ln I \sim \sqrt{U}$  [30].

Такая зависимость характерна для тока, обусловленного туннельным переносом электронов между наночастицами [58]. Туннельный ток возникает потому, что при определенном содержании металла наночастицы, участвующие в процессах туннельного переноса электрона, образуют бесконечный кластер, пронизывающий весь образец композита (порог перколяции) [59]. Барьер для переноса электронов между частицами уменьшается с увеличением их числа в бесконечном кластере и соответствующем уменьшении расстояний между этими частицами. По этой причине соотношение между током и напряжением в синтезированных нанокомпозитах Pb-PPX возвращается к омическому при повышении содержания Pb выше 10 об. % [30]. Перколяционный переход к туннельной проводимости предшествует переходу к металлической проводимости, вызванному прямыми контактами между металлическими наночастицами. В пленках PPX, содержащих нанокристаллы Ag, при содержании металла около 7 об. % имеет место металлический тип проводимости: проводимость композита возрастает с понижением температуры пропорционально коэффициенту  $(1 + \alpha T)^{-1}$ , как и для чистых металлов, однако параметр  $\alpha$  примерно в 2,5 раза меньше значения  $\alpha_0$ , характерного для чистого серебра [56].

PPX-пленки, содержащие полупроводниковые нанокристаллы PbO (образованные окислением нанокристаллов Pb) и PbS, обладают фотопроводимостью [30, 52]. В пленках PbO-PPX значение фототока ( $I_{ph}$ ) в диапазоне длин волн 250 ÷ 350 нм не зависит от длины волны, а отношение между  $I_{ph}$  и темновым током близко к  $10^4$ . При дальнейшем увеличении длины волны до 450 нм величина  $I_{ph}$  постепенно уменьшается до нуля [30].

В пленках PPX, содержащих полупроводниковые нанокристаллы PbS со средним размером около 45 Å, фотопроводимость была обнаружена даже при облучении светом с длиной волны 630 нм. Как следует из UV-Vis спектров пленок, эта длина волны близка к длинноволновому краю электронного поглощения нанокристаллов [52]. Величина  $I_{ph}$  для PbS-PPX композита пропорциональна интенсивности света в степени 0,8–1, а энергия активации фотопроводимости  $\approx 10^{-1}$ – $10^{-2}$  эВ. Энергия кванта света с длиной волны 630 нм составляет около 2 эВ, тогда как работа выхода электрона из нанокристалла PbS превышает 4 эВ.

Это обстоятельство приводит к выводу, что наблюдаемая фотопроводимость обусловлена фотоиндуцированным туннельным переносом элек-



тронов [52]. Данный вывод подтверждается низким значением энергии активации фотопроводимости и нелинейной зависимостью фототока от напряжения, описываемой уравнением  $\ln(I) \sim \sqrt{U}$ , характеризующим туннельный ток (см. выше). Время отклика фототока составляет 0,2–0,5 сек. [52]. Такое довольно высокое значение времени отклика предполагает, что фототок протекает с участием промежуточных долгоживущих электронно-дырочных пар, генерируемых светом в полупроводниковых нанокристаллах и предположительно локализованных на их дефектах (см. [60]).

### Сенсорные свойства

РРХ-пленки, синтезированные в процессе криохимической твердофазной полимеризации и содержащие металлические или полупроводниковые нанокристаллы, имеют мелкопористую структуру. Благодаря такой структуре газообразные соединения легко проникают из окружающей среды в полимерную пленку. В связи с этим получаемые таким методом композитные пленки демонстрируют сенсорные эффекты, обусловленные заметным влиянием на проводимость пленки низкомолекулярных соединений, диффундирующих в полимер и адсорбируемых на нанокристаллах [4, 30, 61–63]. Такие эффекты характерны для пленок, проводимость которых определяется переносом электронов между наночастицами.

Пленки РРХ, содержащие нанокристаллы PbO, являются чувствительными сенсорами влажности. На рис. 10.9 представлена зависимость проводимости РРХ-пленки, содержащей примерно 10 об.% нанокристаллов PbO, от влажности воздуха. Нанокристаллы PbO в матрице РРХ образуются путем окисления нанокристаллов Pb в нанокompозитных пленках Pb-РРХ, полученных путем криохимического синтеза (см. выше).

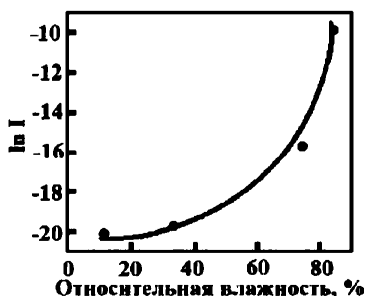


Рис. 10.9. Зависимость силы тока  $I$  в РРХ-PbO пленках от влажности воздуха

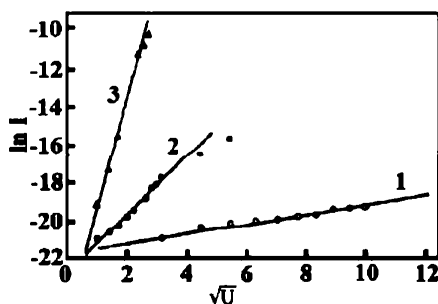


Рис. 10.10. Соотношение между силой тока  $I$  и напряжением  $U$  для РРХ-PbO пленок при различной влажности воздуха: (1) –11%, (2) –75%, (3) –85%

Предполагается, что адсорбция молекул воды на границе между нанокристаллами PbO и полимерной матрицей РРХ приводит к возникновению

локализованных ионных состояний, способствующих снижению барьера для переноса электронов между нанокристаллическими частицами. Зависимость тока от напряжения при различных значениях влажности воздуха (рис. 10.10) свидетельствует о туннельном механизме проводимости [30]. Сложный характер зависимости проводимости от влажности на рис. 10.10 можно объяснить нелинейной зависимостью величины туннельного барьера от количества воды, адсорбированной на наночастицах. Влияние влажности воздуха на проводимость пленки является обратимым: при замещении влажного воздуха на сухой проводимость быстро возвращается к исходному значению для сухого воздуха (рис. 10.11). Как следует из рис. 10.11, время прямого и обратного отклика составляет около 10–15 сек.

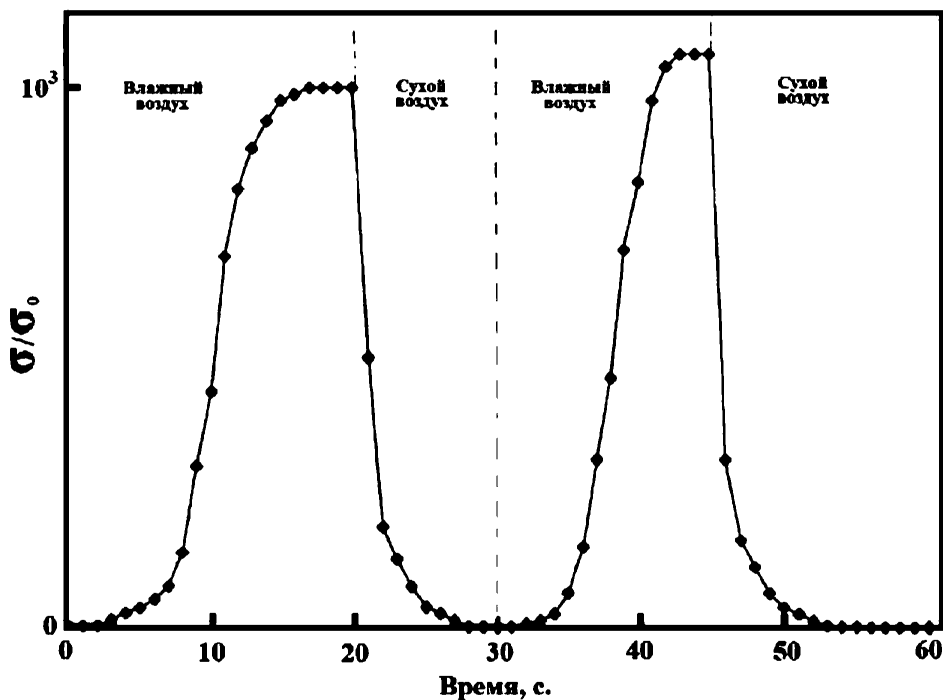


Рис. 10.11. Изменение проводимости пленки  $\sigma$  при замене сухого воздуха на влажный и наоборот.  $\sigma_0$  — проводимость пленки в сухом воздухе

Следует отметить, что существенный рост проводимости в присутствии паров воды наблюдался в работе [58] и для композитной пленки CuS-поливиниловый спирт, полученной классическим жидкофазным методом и содержащей полупроводниковые нанокристаллы CuS. Эффект объясняется тем, что поглощение водяных паров увеличивает диэлектрическую проницаемость полимера, что приводит к увеличению вероятности туннелирования электронов между наночастицами [58].

Такая модель находится в довольно хорошем соответствии с экспериментальными данными, поскольку поливиниловый спирт является гидрофильным полимером, вследствие чего адсорбированная вода растворяется и равномерно распределяется в полимерной матрице. Поэтому макроскопические характеристики полимерной среды могут быть использованы для описания влияния воды. Но эта модель неприменима к нанокompозитным пленкам на основе гидрофобного PPX, где молекулы воды «выталкиваются» из полимера и располагаются на полупроводниковых частицах. Атмосферная влага оказывает на такие пленки гораздо большее влияние, чем на аналогичные композиционные пленки на основе гидрофильного полимера, рассмотренные в работе [58].

PPX-пленки, содержащие нанокристаллы PbO, также демонстрируют значительное увеличение их проводимости под действием небольших количеств паров аммиака и этанола в газовой среде [30, 61, 62]. Эффект от аммиака наблюдается уже в пленках, содержащих 5 об.% PbO. Полагают, что адсорбция аммиака снижает барьер для переноса электрона в большей степени, чем вода, поэтому чувствительность к аммиаку проявляется при меньшей концентрации полупроводниковых частиц. Увеличение проводимости нанокompозитных пленок PbO-PPX в парах этанола происходит при содержании в пленках около 15 об.% PbO [62]. По-видимому, этанол, адсорбированный на поверхности частиц PbO, влияет на барьер переноса электронов между наночастицами в меньшей степени, чем вода и аммиак. Отклик проводимости на аммиак и этанол также обратим: проводимость пленки возвращается к первоначальному значению после удаления этих веществ из окружающей атмосферы.

На рис. 10.12 показан отклик пленки PPX, содержащей нанокристаллы Pd, на малые концентрации водорода при комнатной температуре [63]. Электрическое сопротивление пленки возрастает под воздействием водорода, предположительно, из-за диссоциативной адсорбции молекул водорода на нанокристаллах Pd, что приводит к увеличению работы выхода электрона из этих нанокристаллов [64] и, соответственно, к увеличению барьера для туннельных переносов электронов между нанокристаллами. После удаления водорода сопротивление пленки возвращается к своему начальному значению в течение 30–60 секунд (рис. 10.12), поэтому такие пленки могут использоваться в качестве обратимого сенсора на водород.

Следует отметить, что присутствие водорода влияет на зависимость тока от напряжения в пленках Pd-PPX (рис. 10.13). Исходная пленка в отсутствие водорода демонстрирует линейную зависимость тока от напряжения, однако в присутствии водорода эта зависимость приобретает сильно нелинейный характер и подчиняется уравнению  $\ln I \sim \sqrt{U}$  (см. выше). Водород, проникающий в пленку, разрушает пути туннельного тока в исходной

пленке. В то же время известно, что поглощение водорода частицами Pd сопровождается искажением решетки Pd и может привести к существенной шероховатости поверхности частиц. В результате электрическое поле между наночастицами может превышать на несколько порядков среднюю интенсивность поля в пленке. Это приводит к увеличению влияния поля на туннельную проводимость и появлению новых путей туннельного тока. Поэтому, как видно из рис. 10.13, уже при довольно низких напряжениях падение проводимости под действием водорода заменяется увеличением проводимости.

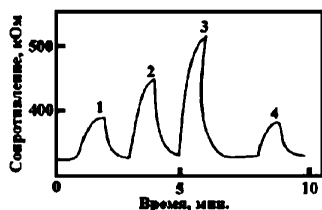


Рис. 10.12. Кинетика изменения сопротивления ( $R$ ) PPH-Pd пленок при их контакте с водородом при его различном давлении

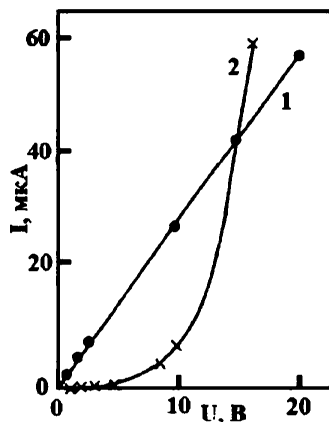


Рис. 10.13. Зависимость силы тока ( $I$ ) от напряжения ( $U$ ) при комнатной температуре для PPH, содержащего нанокристаллы Pd: 1 — в чистом воздухе; 2 — в атмосфере водорода при его давлении 1 атм

## Ферромагнитные свойства. Запись и считывание информации

Пленки с высокой концентрацией ферромагнитных наночастиц находят применение в системах записи, считывания и хранения информации. Особенности ферромагнитных материалов, позволяющие использовать их для магнитной записи, заключаются в том, что эти материалы состоят из доменов, каждый из которых характеризуется определенным направлением магнитного импульса. В отсутствие внешнего магнитного поля магнитные моменты всех доменов хаотичны, а результирующий момент ферромагнитного материала равен нулю. При приложении внешнего магнитного поля

магнитные моменты доменов в этой области упорядочиваются и принимают направление вдоль поля, тем самым намагничивая материал. Такой отклик системы действительно является формой записи информации, поскольку направление импульса домена сохраняется после снятия магнитного поля. В этом случае предельная плотность записи определяется величиной доменов и расстоянием между ними. Однако в обычных ферромагнитных материалах, которые используются в магнитных жестких дисках, домены взаимодействуют друг с другом, что ограничивает плотность записи информации, достижимую для данного размера материала. Плотность записи может достигать величины  $\sim 10^{12}$  бит/см<sup>2</sup>.

В полимерных композитных материалах ферромагнитные наночастицы представляют собой монодомены, изолированные друг от друга в немагнитной полимерной матрице. В таких материалах магнитные моменты наночастиц не взаимодействуют друг с другом, поскольку электронный обмен между ферромагнитными частицами незначителен при расстояниях между частицами больше 1 нм. Поэтому каждая наночастица может рассматриваться, как один информационный бит. В зависимости от направления магнитного момента относительно направления внешнего магнитного поля частица находится в логическом состоянии 0 или 1. В металл-полимерных материалах с высоким содержанием ферромагнитных наночастиц, полученных методом твердофазной полимеризации пленок, осажденных из газовой фазы, плотность записи данных может быть значительно увеличена.

Записанную информацию можно прочитать, используя эффект отрицательного магнитосопротивления, то есть уменьшение электрического сопротивления материала в магнитном поле. Этот эффект наблюдался в различных нанокompозитных материалах, содержащих магнитные нанокристаллы в матрице из немагнитного металла или диэлектрика [65]. Магнитные моменты нанокристаллов были ориентированы сильным магнитным полем. Отрицательное магнитосопротивление композитных пленок с ферромагнитными наночастицами, включенными в диэлектрическую матрицу, обусловлено тем, что вероятность туннельного переноса электронов между соседними наночастицами возрастает, если эти наночастицы имеют параллельную ориентацию спинового магнитного момента [66].

Явление отрицательного магнитосопротивления в PРХ-композитных пленках, содержащих частично окисленные ферромагнитные Fe-наночастицы, наблюдали в работе [4]. Относительное изменение проводимости в магнитном поле  $H = 11$  кЭ составляет 34% при напряжении около 30 В. После снятия магнитного поля проводимость пленки возвращается к первоначальному значению, т. е. влияние магнитного поля на проводимость обратимо. Полное окисление наночастиц Fe разрушает этот эффект. До-

статочно подробный обзор работ по элементарным процессам, приводящим к изменению магнитного момента ферромагнитных наночастиц при различных внешних воздействиях, дан в монографии [67].

## Диэлектрические свойства

Пленки чистого РРХ и композитов РРХ, полученные в результате криохимического твердофазного синтеза, были исследованы методом диэлектрической спектроскопии [68]. Этот метод оказался очень полезным для изучения структуры и динамики полимерных материалов, а также механизма переноса носителей заряда. Высокая чувствительность диэлектрических методов испытаний к морфологическим изменениям структуры полимера делает эти методы исключительно перспективными для изучения особенностей структуры полимера.

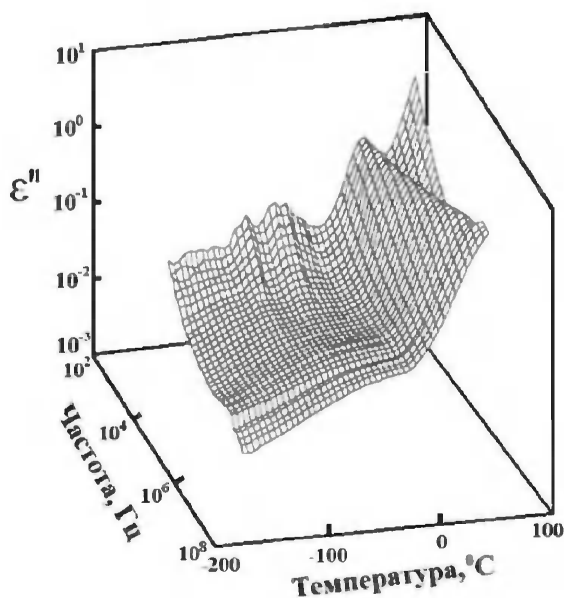
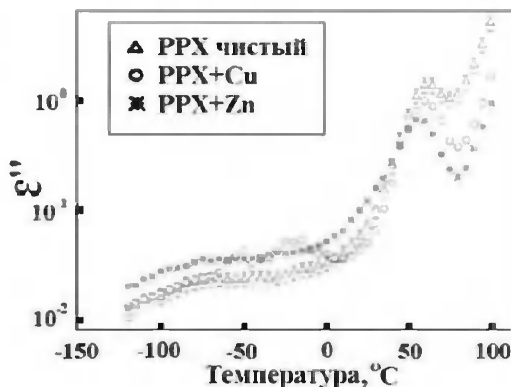


Рис. 10.14. Трехмерная зависимость диэлектрических потерь  $\epsilon''$  образца РРХ — 8 об.% Си от частоты и температуры. Точность измерения диэлектрических потерь составляла  $\pm 3\%$

На рис. 10.14 приведен трехкоординатный график мнимой части ( $\epsilon''$ ) комплексной диэлектрической проницаемости  $\epsilon^*(\omega) = \epsilon' - i\epsilon''$  в зависимости от частоты  $\omega$  и температуры для композитной пленки РРХ, содержащей 8 об.% Си. Диэлектрические потери можно рассматривать в терминах нескольких распределенных релаксационных процессов, характеризуемых некоторыми общими чертами для всех образцов. На рис. 10.15 представлена температурная зависимость диэлектрических потерь для чистой мат-

рицы PPX и полимерной матрицы PPX с добавлением Cu (8 об.%) и Zn (8 об.%) при частоте 1 кГц, так как эта частота характерна для всех релаксационных переходов.

**Рис. 10.15.** Температурная зависимость диэлектрических потерь  $\varepsilon''$  при частоте 1 кГц PPX ( $\Delta$ ), PPX + 8 об.% Cu, (o), и PPX + 8 об.% Zn, (\*)



В интервале температур от  $-70$  до  $0$  °C и в низкочастотном диапазоне обнаружен диэлектрический релаксационный процесс для полимеров. Этот процесс четко прослеживается в образце PPX + Cu. В то же время в образце PPX + Zn наблюдаются только следы этого процесса, а в PPX + PbS и в чистой матрице PPX такой процесс полностью исчезает. Амплитуда этого процесса существенно уменьшается при увеличении частоты, а максимум диэлектрических потерь практически не зависит от температуры. Это типичный диэлектрический отклик на перколяционное поведение [69, 70]. Рассматриваемый диэлектрический процесс может относиться к переносу электронов между металлическими наночастицами через полимерную матрицу. Данные по электропроводности металлических пленок PPX (см. выше) показывают, что при концентрации металлов более 5 об.% существует значительная вероятность переноса электрона из одной частицы в другую и, таким образом, эти частицы вовлечены в процесс перколяции.

Анализ параметров диэлектрической релаксации этого процесса позволил определить фрактальные свойства перколяционного кластера [68]. Диэлектрический отклик для этого процесса во временной области можно описать выражением Kohlrausch–Williams–Watts (KWW)

$$\Psi(t/\tau) \sim \exp[-(t/\tau)^\nu],$$

где  $\Psi$  — дипольная корреляционная функция,  $\tau$  — среднее время релаксации,  $\nu$  — параметр ( $0 < \nu \leq 1$ ), характеризующий фрактальные свойства кластера. В сложных фрактальных системах для релаксации, вызванной переносом заряда вдоль разветвленного пути, параметр  $\nu$  может быть

связан с фрактальной размерностью  $D_f$  перколяционного кластера выражением  $\nu = D_f/3$  [71].

Для образца РРХ – Cu фрактальная размерность  $D_f$  равна 2,609 [66]. Следует отметить, что вышеупомянутое распределение металлических наночастиц по размерам приводит к взаимозаряджению таких частиц в перколяционном кластере. Этот эффект обсуждается в следующем разделе в связи с катализом наночастицами. Как указано в [68], специфический низкотемпературный пик диэлектрических потерь в синтезированных композитных образцах РРХ + Cu связан с взаимодействием электромагнитного поля с взаимно заряженными наночастицами Cu, иммобилизованными в матрице РРХ. Малая величина этого пика в РРХ + Zn может быть обусловлена окислением наночастиц цинка.

Высокотемпературный процесс релаксации в исследованных композициях типичен для аморфных полимеров и может быть отнесен к  $\alpha$ -релаксации, которая проявляется во всем диапазоне частот и в интервале температур от 50 до 100 °C (рис. 10.14 и 10.15). Этот процесс наблюдается во всех образцах и соответствует переходу аморфной фазы из стеклообразного в резиноподобное состояние.

Пик диэлектрических потерь этого процесса отражает его вязкоупругую природу, вследствие которой максимум диэлектрических потерь смещается в сторону более высоких температур при более высоких частотах. Этот процесс описывается эмпирической формулой Гавриляка–Негами:

$$\varepsilon^*(\omega) \sim \frac{\Delta\varepsilon}{[1 + (i\omega\tau')^\alpha]^\beta}.$$

Здесь  $\Delta\varepsilon$  — диэлектрическая проницаемость, а  $\tau'$  — среднее время релаксации. Параметры  $\alpha$  и  $\beta$  описывают симметричное и асимметричное уширение релаксационного процесса. Температурные зависимости времен релаксации наблюдаемого  $\alpha$ -релаксационного процесса для чистых образцов РРХ, РРХ + Cu и РРХ + Zn демонстрируют аррениусовскую зависимость с энергиями активации 196 кДж/моль, 187 кДж/моль и 201 кДж/моль, соответственно, которые коррелируют с энергиями активации  $\alpha$ -процесса в наиболее известных полимерных материалах [72].

## Каталитическая активность

Адсорбция химических соединений на наночастицах синтезированных композитов не только вызывает появление электрических сенсорных эффектов, но может привести также к новым каталитическим процессам, вызванным поверхностными свойствами таких наночастиц [59]. Важные каталитические свойства композитов РРХ-металл, полученных в результате твер-

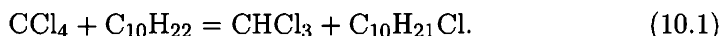


дофазной криохимической полимеризации пленки, осажденной из газовой фазы, были обнаружены при изучении изомеризации 3,4-дихлорбутена в транс- и цис-1,4-дихлорбутен, катализируемой Pd-наночастицами Pd-PPX [63], и реакции метатезиса связей C-Cl в смеси н-декана с  $\text{CCl}_4$ , катализируемой Cu-наночастицами в композите Cu-PPX [73].

Каталитическую изомеризацию 3,4-дихлорбутена изучали при 100 °C в толуоле [63]. Отношение транс/цис-изомеров 1,4-дихлорбутена, образующихся в результате реакции с обычным палладиевым катализатором, составляет около 10. Такой же результат получен и в результате каталитической изомеризации 3,4-дихлорбутена на Pd-PPX с низким содержанием наночастиц Pd. Однако селективность реакции в такой системе уменьшается с увеличением концентрации Pd: выход транс-1,4-дихлорбутена уменьшается, а выход цис-1,4-дихлорбутена остается постоянным. Этот результат показывает, что изменение каталитических свойств композита определяется взаимодействием между наночастицами. При каталитической реакции под действием пленок Pd-PPX, когда объемное содержание наночастиц Pd близко к порогу перколяции, транс/цис отношение для полученных изомеров 1,4-дихлорбутена составляет около 2,9, что близко к равновесному значению этого отношения.

Специфические каталитические свойства синтезированных Pd-PPX нанокompозитов объясняются переносом заряда между наночастицами при концентрациях металлов, близких к порогу перколяции, когда расстояние между наночастицами уменьшается до нескольких нанометров, а электроны могут туннелироваться от одной наночастицы металла к другой [58]. Влияние расстояния между наночастицами на их каталитические свойства наблюдалось при окислении CO частицами Pd (размером 2,8-13 нм), иммобилизованными на поверхности MgO [74]. Наночастицы, внедренные в полимерную матрицу, имеют довольно широкое распределение по размерам (см. выше). В то же время энергия уровня Ферми малых металлических частиц сильно зависит от их размера и формы [10, 75]. Перенос электронов между частицами разного размера приводит к их взаимному заряджению, что сопровождается выравниванием их электрохимических потенциалов [75]. Заряджение металлических наночастиц должно сильно влиять на каталитическую активность. В частности, изомеризация 3,4-дихлорбутена на положительно заряженных наночастицах Pd, приводящая к получению смеси изомеров 1,4-дихлорбутена, состав которой близок к равновесному, происходит, скорее всего, через промежуточные карбониевые ионы [63].

Каталитическая реакция метатезиса C-Cl-связей под действием нанокompозитной пленки Cu-PPX была изучена в смеси н-декана с  $\text{CCl}_4$  при молярном соотношении  $\text{CCl}_4/\text{н-декан} = 4 : 1$  [73]:



Реакцию проводили в отсутствие кислорода при 180 °С в течение 4 часов. Данные о выходе хлордеканов, а также значения удельной каталитической активности, которая определяется как количество образовавшихся молекул хлордеканов в расчете на один атом меди в нанокомпозитной пленке в течение одного часа, представлены в табл. 10.2. Данные о реакции сопоставлены с данными о электрическом сопротивлении ( $R$ ) композитных пленок.

При очень малой концентрации  $\text{Cu}$  ( $X_{\text{Cu}}$ ) около 1 об.% сопротивление композитной пленки близко к сопротивлению чистого РРХ. В этом случае наночастицы  $\text{Cu}$ , полностью изолированные в матрице, практически не взаимодействуют друг с другом и не влияют на проводимость композита. Но, как видно из таблицы, увеличение  $X_{\text{Cu}}$  даже до 3,5 об.% приводит к резкому падению сопротивления в результате переноса заряда между наночастицами  $\text{Cu}$ . Вероятность такого переноса возрастает экспоненциально с уменьшением расстояния между частицами при увеличении  $X_{\text{Cu}}$ .

В то же время снижение сопротивления в температурном интервале от 77 до 298 К свидетельствует о том, что даже при максимальной концентрации  $\text{Cu}$  композитная пленка представляет собой систему металлических «островков», диспергированных в диэлектрической матрице. Истинный порог перколяции [76], при котором композитная пленка приобретает характер металла, характеризующийся увеличением  $R$  с температурой, не достигается. С другой стороны данные о сопротивлении композита (табл. 10.2) показывают, что при  $X_{\text{Cu}}$  в диапазоне 5–10 об.% полученный ансамбль наночастиц меди в РРХ-матрице близок к порогу перколяции. Дальнейшее увеличение  $X_{\text{Cu}}$  до 14% приводит к взрывной агрегации наночастиц и образованию изолированных крупноразмерных включений металла: этот процесс сопровождается существенным уменьшением числа металлических наночастиц и соответствующим увеличением  $R$  (табл. 10.2).

**Таблица 10.2.** Зависимость проводимости и каталитической активности нанокомпозитов  $\text{Cu}$ -РРХ в реакции метатезиса  $\text{C-Cl}$ -связей в смеси  $n$ -декана с  $\text{CCl}_4$  от содержания  $\text{Cu}$

Содержание $\text{Cu}$ , об.%	Электрическое сопротивление при 77К, Ом	Электрическое сопротивление при 298 К, Ом	Выход хлордеканов, мол.%	Удельная каталитическая активность
1,3	$\infty$	$\infty$	следы	следы
3,5	$7,0 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	4	130
5,0	$10,2 \times 10^3$	$8,3 \times 10^3$	15	500
7,0	$3,3 \times 10^3$	645	20	650
10,3	66	29	35	1150
14	$16,2 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	14	450

При очень малых  $X_{Cu}$  каталитическая активность полностью изолированных и не взаимодействующих между собой медных наночастиц в РРХ очень мала (см. табл. 10.2). Увеличение  $X_{Cu}$  приводит к значительному повышению каталитической активности, которая достигает максимума вблизи порога перколяции в условиях наиболее эффективного взаимодействия между наночастицами металлов, изолированных в полимерной матрице. Агрегация металлических наночастиц приводит к падению каталитической активности. Максимальная удельная активность такого катализатора, определяемая как число молекул хлордекана, образовавшихся в течение 1 часа в расчете на 1 атом меди, составляет 1150. Это значение гораздо больше, чем активность всех известных катализаторов этой реакции на момент публикации работ [63, 73]. Для сравнения была исследована та же реакция метатезиса связей C-Cl под действием специально полученного катализатора, содержащего 1 мас. % высокодисперсной металлической меди, осажденной на кремнеземе. В условиях, аналогичных условиям реакции на нанокompозитной пленке Cu-PPX, удельная активность этого катализатора составляла 4. Кроме того, он имеет низкую селективность: в этом случае реакция сопровождается образованием побочных продуктов в результате протекания процессов конденсации. В то же время реакция на Cu-PPX катализаторе дает только монохлорзамещенные деканы.

Процесс инициирования реакции (I) заключается в разрыве связей C-Cl, сопровождающимся образованием радикалов  $CCl_3$ :



Затраты энергии на диссоциацию молекулы  $CCl_4$  в газовой фазе ( $E_i^v$ ) отличаются от затрат энергии на диссоциацию молекулы, адсорбированной на наночастице меди ( $E_i^{ad}$ ), на величину

$$E_i^v - E_i^{ad} = Q^{ad}(Cl) + Q^{ad}(CCl_3) - Q^{ad}(CCl_4),$$

где  $Q^{ad}(X)$  — теплота адсорбции соответствующей молекулы на Cu. Полученные результаты (табл. 10.2) приводят к выводу, что влияние наночастиц Cu на реакцию при очень низком содержании металла, когда эти частицы в РРХ матрице расположены далеко друг от друга, и перенос заряда между ними практически невозможен, является весьма незначительным.

Повышение реакционной способности композита с ростом содержания металла можно объяснить сближением этих частиц и переносом электронов между ними, что приводит к взаимному заряджению наночастиц Cu различного размера [75]. Адсорбция  $CCl_4$  на образующихся отрицательно заряженных частицах, по-видимому, облегчает процесс инициирования, поскольку при этом величина  $E_i^v - E_i^{ad}$  должна увеличиваться, главным об-

разом, из-за очень большого сродства к электрону у атома хлора (3,6 эВ). Следовательно, в этом случае, можно ожидать снижения затрат энергии на диссоциацию молекулы, адсорбированной на  $\text{Cu}$ , и, соответственно, увеличения скорости диссоциации  $\text{CCl}_4$ .

Влияние заряда на диссоциацию  $\text{CCl}_4$  должно быть особенно сильным на дефектной поверхности наночастиц вследствие того, что работа выхода электрона уменьшается из-за резкого увеличения плотности заряда в области дефектов. В этой связи следует отметить, что в наночастице большое количество атомов металлов находится на поверхности наночастицы (например, на поверхности  $\text{CdS}$ -частицы размером 5 нм содержится около 15% атомов) [59]. Структура и свойства такой обширной поверхности раздела между частицей и окружающей средой в значительной степени зависят от этой среды. Наночастицы, образующиеся в газовой фазе, характеризуются квазиравновесной поверхностью, которая почти такая же, как у массивного металла. В то же время наночастицы, полученные и иммобилизованные в твердой или высоковязкой матрице, могут иметь дефектную шероховатую поверхность из-за затруднения формирования равновесной поверхности структуры из матрицы. В результате каталитические свойства таких наночастиц могут сильно зависеть от природы полимерной матрицы (см. [77]).

#### 10.4. Применение металл-полимеров в биологии и медицине

Полимерные, в том числе поли-*p*-ксилиленовые, наноструктурированные композиты, содержащие металлические наночастицы (благородные металлы, медь, серебро или золото), в настоящее время находят применение в различных областях биологии и медицины [78]. Известно, что такие металлы, особенно серебро, являются одним из средств борьбы с различными заболеваниями, в том числе, с заболеваниями, вызванными патогенными микроорганизмами. В частности, наночастицы  $\text{Ag}$  широко применялись как антимикробные агенты в лечебном и профилактическом здравоохранении еще до появления синтетических лекарств, таких как пенициллин [79].

Биомедицинское действие наночастиц  $\text{Ag}$  и  $\text{Cu}$  обусловлено ионами этих металлов, образующимися в результате процессов окисления на поверхности наночастиц во влажном воздухе. Ионы переходят в окружающую среду и проникают в клетки бактерий, в результате чего происходит дезинтеграция клеток путем разрыва клеточных стенок или мембран [80]. Под действием этих ионов нарушается синтез белков в клетках бактерий, что также приводит к гибели бактерий. Соли металлов и комплексы ионов

металлов также являются эффективными противомикробными агентами, но их использование может привести к вредным последствиям, в частности, нежелательной адсорбции ионов в клетках кожи человека. Кроме того, в отличие от антибиотиков, которые могут разрушить полезные ферменты, коллоидные металлы оставляют эти ферменты неповрежденными [81]. Таким образом, металлические наночастицы, по-видимому, более предпочтительны для их использования в качестве противомикробных средств, по сравнению с солями и комплексами катионов металлов.

Высокая антибактериальная эффективность нанодисперсного металла обусловлена его высокой удельной поверхностью. Кроме того, поверхность наночастиц зависит от метода их формирования и отличается от обычной поверхности металла тем, что содержит различные дефекты, которые облегчают переход ионов металла в окружающую (обычно, водную или спиртовую) среду. Проблема в том, что металл в нанодисперсном состоянии нестабилен вследствие склонности металлических наночастиц к агрегации. Внедрение наночастиц в полимерную матрицу является простым и эффективным способом предотвратить их агрегацию. Это позволит использовать специфические свойства металлических наночастиц в различных, в том числе, медицинских и биологических приложениях.

Из металл-полимерных композитов наиболее эффективными противомикробным действием обладают полимерные композиты с наночастицами Ag и Cu. Полимерные пленки с наночастицами этих металлов обладают бактериостатическими и антигрибковыми свойствами [82–84]. В качестве полимерных матриц наряду с натуральными полимерами (полисахариды и протеины) были использованы как гидрофобные (полиэтилен, полипропилен, полиуретан) [85, 86], так и гидрофильные (поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль, поливинилацетат) [87, 88] синтетические полимеры. Было установлено, что полимерные композиты с наночастицами Cu проявляют более сильный бактерицидный эффект, чем композиты с наночастицами Ag. Это объясняется тем, что выход ионов Cu из наночастиц Cu, заключенных в полимерную матрицу, происходит более интенсивно, чем выход ионов Ag из наночастиц Ag аналогичного металл-полимерного композита [80]. Отмечено также, что введение в полимерную пленку одновременно с наночастицами Ag следов Au приводит к резкому ускорению выхода ионов Ag из пленки и соответственному росту антибактериального действия пленки. Полученные данные можно объяснить образованием гальванически связанных наночастиц Ag и Au, в результате чего образование ионов Ag многократно возрастает [89].

Бактерицидные свойства пленок зависят от характеристик полимера и концентрации металлических наночастиц. Бактерицидное действие композитных полипропиленовых пленок, содержащих наночастицы Ag и Cu,

на патогенные бактерии усиливается в результате обработки поверхности пленок аргоновой плазмой. Это объясняется увеличением «шероховатости» поверхности пленок вследствие образования поверхностных дефектов, что приводит, в частности, к повышению гидрофильности поверхности [85].

Эффективность воздействия полимерных нанокompозитов, содержащих наночастицы Ag, на патогенные бактерии исследована в работе [90]. Было установлено, что антибактериальное действие таких покрытий связано с исключительно малым расходом серебра, составляющим  $0,1 \text{ г/м}^2$ . При этом антибактериальная эффективность коррелирует с интенсивностью перехода ионов серебра от наночастиц в окружающую, в основном, водную среду.

Процесс коррозии наночастиц серебра в композитной пленке при использовании ее в качестве антибактериального покрытия можно условно разделить на три стадии [91]: (i) диффузия воды в полимерную пленку, (ii) образование ионов серебра в результате взаимодействия молекул воды с окисленным поверхностным слоем наночастиц и (iii) миграция ионов серебра через полимерную пленку в окружающую среду. В то же время исследования показали, что антибактериальное действие полимерных композитов с наночастицами Ag и Cu связано не только с проникновением в бактерии ионов металлов, переходящих в бактериальный раствор из композитов. Обнаружено, что в раствор переходят также металлические наночастицы полимерного нанокompозита, которые затем внедряются в бактерии, значительно усиливая антибактериальное действие металла [80]. В этом случае антибактериальная способность таких наночастиц связана с сильным взаимодействием между наночастицами и полимерным каркасом клетки бактерии, что способствует улавливанию свободных ионов  $\text{Ag}^+$ .

Проникновение металлических наночастиц в бактерию можно разделить на три этапа. Сначала наночастица прилипает к мембране, затем мембрана обволакивает наночастицу и, наконец, происходит отделение от мембраны комплекса между частицей и липидным слоем, что нарушает полимерный каркас клетки [80].

Полученные данные показывают, что полимерная основа, в которую внедрены наночастицы серебра, оказывает сильное влияние на переход ионов от металлических наночастиц полимерного нанокompозита в окружающую водную среду и тем самым на антибактериальное действие нанокompозита. В наноструктурированных металл-полимерных пленках в процессе эксплуатации их в качестве бактерицидных покрытий происходит равномерный контролируемый выход ионов металла из пленки в окружающую среду, обеспечивая длительное антибактериальное действие таких покрытий.

Особый интерес наноструктурированные полимерные (в основном, поли-*p*-ксилиленовые) пленки представляют в качестве основы для металлических слоев (главным образом, серебра или золота), используемых при анализе биологических объектов методом гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). Было обнаружено огромное (в ряде случаев до  $10^{10}$ ) увеличение интенсивности комбинационного рассеяния (КР) молекул, адсорбированных на этих металлах [92]. Это происходит за счет возбуждения светом электромагнитных волн (плазмонов) на поверхности металла, что приводит к увеличению индуцированного светом дипольного момента молекулы, адсорбированной на металле [93]. Эффекты ГКР проявляются, когда частота падающего света находится в резонансе с частотой поверхностных плазмонов, которая определяется характеристиками металла [81, 93–95]. Для благородных металлов резонанс происходит в области видимого излучения [96], поэтому эти металлы используются в экспериментах с ГКР. Важно то, что поверхностные плазмоны возникают при действии света только на шероховатые наноструктурированные металлические поверхности, и ГКР молекул, адсорбированных на таких поверхностях, зависит от топологии поверхности, т. е. от характера, размера и распределения поверхностных неоднородностей [81, 93, 94].

Спектроскопия ГКР очень перспективна для медицинской диагностики. Однако для применения и дальнейшего развития этого метода биомедицинского анализа необходимы металлические субстраты с контролируемой наногетерогенной морфологией. В этом случае для молекул, адсорбированных на субстрате, удастся получать воспроизводимые спектры ГКР с максимальным усилением КР под действием металла [81]. Субстратами обычно являются наногетерогенные металлические слои толщиной порядка 50–100 нм, нанесенные на диэлектрическую основу в результате осаждения паров металла [81]. Морфология таких металлических субстратов определяется морфологией диэлектрической основы, на которую они наносятся. Поэтому для применения ГКР в биомедицинском анализе принципиальное значение имеет получение прочных стабильных диэлектрических подложек с однородной наногетерогенной поверхностью. В работе [81] показано, что в этом отношении особенно хорошие характеристики имеют поли-*p*-ксилиленовые пленки, полученные осаждением строго направленного потока паров *p*-ксилиленового мономера на гладкие стеклянные или кремневые пластины. Осаждение мономера сопровождается полимеризацией, которая приводит к образованию полимерной пленки, представляющей собой конгломерат параллельных нановолокон. Затем на полученную наноструктурированную полимерную пленку наносится из газовой фазы металл (Au или Ag), в результате чего формируется металлический слой для регистрации ГКР спектров адсорбированных на

нем биомолекул [97]. Сформированные таким образом металл-полимерные пленки обладают большими преимуществами по сравнению с традиционными субстратами для ГКР, поскольку в этом случае можно строго контролировать поверхность полимерной пленки и, соответственно, морфологию, в частности, степень неоднородности или «шероховатость» поверхности металлического слоя, нанесенного на полимерную основу [81].

Использование в качестве субстратов для ГКР слоев серебра или золота, нанесенных на поверхность поли-*p*-ксилиленовых пленок, позволило с помощью ГКР-спектроскопии разработать методы селективной и высокочувствительной идентификации вирусов и штаммов различных, в том числе, болезнетворных бактерий [81, 98, 99], а также биологически активных соединений [100].

## Заключение

Криохимический синтез металл-полимерных пленок из газовой фазы (от газообразного состояния до твердого полимера, минуя жидкую фазу) позволяет получать как новые металлоорганические структуры, так и новые композитные материалы с высоким содержанием напоразмерных металлических или полупроводниковых частиц, обладающие широким спектром ценных эксплуатационных свойств. Вместе с тем, следует отметить, что практическое использование различных физико-химических явлений на основе металл-полимерных структур не всегда оказывается успешным. Так, например, нанокомпозитные полупроводниковые сенсоры [101-103] демонстрируют гораздо более продвинутое эксплуатационные характеристики по сравнению с металл-полимерными аналогами.

Твердофазный синтез этого типа привлекает особое внимание в связи с возможностью формирования и стабилизации небольших кластеров атомов металлов или полупроводниковых молекул в полимерной матрице при температуре окружающей среды и даже более высоких температурах. Зависящие от размера квантовые состояния таких нанокластеров, являющиеся промежуточной формой между атомами металла и объемным металлом, могут приводить к появлению новых электронных, оптических и магнитных эффектов [104]. Структура и свойства кластеров в синтезированных полимерных системах в настоящее время исследованы явно недостаточно. Вместе с тем изучение этих нанокластеров в довольно широком диапазоне температур (до 300–320 К) и в различных полимерных матрицах может дать представление о правильном направлении разработок важных фундаментальных и прикладных задач.



Агрегация нанокластеров при нагревании криохимически синтезированных систем приводит к образованию полимерных композитов, содержащих нанокристаллы металлов или полупроводников. Полученные таким образом композиты, в отличие от других аналогичных материалов, демонстрируют заметное увеличение содержания мелких кристаллов при повышении количества введенного в полимер неорганического компонента (металла или полупроводника), хотя средний размер нанокристаллов при этом остается практически постоянным. Следует отметить, что влияние размера частиц металла на энергию уровня Ферми и работу выхода электрона из частицы становится заметным для наночастиц размером менее 5 нм [10]. Соответственно, взаимное заряджение металлических наночастиц, включенных в полимерный композит, может существенно влиять на физические и химические свойства композита, если концентрация таких наночастиц достаточно велика, чтобы обеспечить туннельный перенос электронов между ними во всем объеме композита, как это имеет место в синтезированных композитах, где они являются основной частью общего количества частиц даже при высоком содержании металла.

Использование метода низкотемпературной твердофазной полимеризации при осаждении на подложку паров смеси металла (или полупроводника) и мономера позволяет варьировать структуру полимерной матрицы в довольно широком диапазоне. В этой связи следует отметить, что в качестве исходных соединений могут быть использованы *p*-ксилилен и его производные, содержащие различные заместители, в том числе высокополярные [24, 43], а также другие мономеры (см., например, [19]). Хотя изучение криохимического твердофазного синтеза, а также структуры и свойств полученных материалов не приобрело еще достаточного развития, становится ясно, что этот синтез дает многообещающие результаты для получения новых металлосодержащих полимеров, которые представляют большой интерес для различных областей науки и техники.

Полимерные композиционные материалы, содержащие металлические наночастицы (главным образом, меди, серебра и золота), важны также для медицины, где они применяются в качестве бактерицидных материалов. В обзоре рассматриваются работы, в которых обсуждаются и анализируются бактерицидные свойства таких материалов в зависимости от природы и размера наночастиц, а также структуры и физико-химических характеристик полимерной матрицы. Обсуждается механизм бактерицидного действия материалов.

Большое значение для биологии и, в частности, для детектирования и анализа биологических молекул имеют нанокompозитные системы, состоящие из полимерной основы со строго определенной и контролируемой наногетерогенной поверхностью и нанесенной на нее тонкой металличе-

ской пленкой, которая повторяет морфологию полимерной поверхности. Использование таких систем позволяет получать воспроизводимые спектры гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) биомолекул, адсорбированных на металлическом субстрате, и тем самым определять структуру этих молекул даже при их очень малой концентрации.

В качестве полимерной основы для металлических слоев с однородной наногетерогенной поверхностью особенно хорошими характеристиками обладают поли-*p*-ксилиленовые пленки, получаемые осаждением строго направленного потока паров *p*-ксилиленового мономера на гладкие стеклянные или кремневые пластины с одновременной полимеризацией осажденного мономера. В обзоре рассмотрено применение спектроскопии ГКР на наногетерогенных металл-поли-*p*-ксилиленовых пленках для детектирования и анализа различных биологических объектов.

## Авторы

**Герасимов Генрих Николаевич**, д.х.н., ведущий научный сотрудник ИХФ РАН. Область научных интересов: физика и химия наносистем, процессы полимеризации при низких и сверхнизких температурах

**Громов Владимир Федорович**, д.х.н., профессор, научный руководитель НИФХИ им. Л.Я. Карпова, ведущий научный сотрудник ИХФ РАН. Область научных интересов: синтез и свойства наноструктурированных материалов, радикальная полимеризация

**Иким Мария Ильинична**, к.ф.-м.н., научный сотрудник ИХФ РАН. Область научных интересов: физика и химия наносистем, свойства наноструктурированных материалов

**Трахтенберг Леонид Израйлевич**, д.ф.-м.н., профессор, заведующий лабораторией ИХФ РАН. Область научных интересов: физика и химия наносистем и сенсорных явлений.

## Литература

1. *Woehrle D.* Metal Complexes, Zero-Valent Metals and Metal Clusters Physically Connected with Macromolecular Compounds, in: F. Ciardelli, E. Tsushida, D. Woehrle, ed., *Macromolecule-Metal Complexes*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1996, 100 p.
2. *Помогайло А.Д., Розенберг А.С., Уфлянд И.Е.* Наночастицы металлов в полимерах, М., «Химия», 2000 г., 673 стр.
3. *Andrews A.M.P., Ozin G.A.* Wrapping oligomers and polymers around metal atoms, metal clusters, and metal colloids. — *Chem. Matt.* 1989, 1, 174.
4. *Трахтенберг Л.И., Герасимов Г.Н., Григорьев Е.И.* Нанокластеры металлов и полупроводников в полимерных матрицах: синтез, структура и физико-химические свойства. — *Ж. физ. химии* 1999, 73, 209.

5. *Klabunde K.J.* Free atoms, clusters and Nanoscale Particles. — San Diego: Academic Press, 1994, 311 p.
6. *Ritala M., Kukli K., Rahtu A., Raisanen P.I., Leskela M., Sajavaara T., Keinonen J.* Atomic layer deposition of oxide thin films with metal alkoxides as oxygen sources. — Science 2000, **288**, 319.
7. *Gerasimov G.N., Trakhtenberg L.I.* Vapor Deposited Composite Films Consisting of Dielectric Matrix with Metal/Semiconductor Nanoparticles, pp. 456-503// in: Physico-Chemical Phenomena in Thin Films and at Solid Surfaces, Edited by L.I. Trakhtenberg, S.H. Lin and O.J. Ilegbusi, Elsevier Inc., Amsterdam, 782 pp, 2007.
8. *Герасимов Г.Н., Громов В.Ф., Трахтенберг Л.И.* Сенсоры на основе смесанных полупроводниковых нанокомпозитов, стр 487-537, в монографии «Синтез, строение и свойства металл/полупроводник содержащих наноструктурированных композитов», под редакцией Л.И. Трахтенберга, М.Я. Мельникова, ТЕХНОСФЕРА, Москва, 2016, 622 стр.
9. *Moskovits M., Ozin G.A.* Cryochemistry, John Wiley & Sons, N. Y. 1976, 594 p.
10. *Schumacher E.* Metal clusters: between atom and bulk. — Chimia 1988, **42**, 357.
11. *Andrews M.P., Ozin G.A.* Silver atom agglomeration in monomeric and oligomeric olefinic matrices. — J. Phys. Chem. 1986, **90**, 2922.
12. *Петрухина М.А., Александрова Л.Н., Загорский В.В., Сергеев Г.Б., Кардаш И.Е., Герасимов Г.Н.* Низкотемпературная твердофазная полимеризация металл-п-ксилиленовых мономеров, Материалы 5-й Всесоюзной конференции по низкотемпературной химии, Декабрь, 10-13, 1991, МГУ, Москва, стр. 130.
13. *Zoelner R.W., Klabunde K.J.* Reactions of metal atoms with alkynes. 2. Cocondensation reactions of germanium and tin atoms with acetylene and formation of integral metal-acetylene polymers. — Inorg. Chem. 1984, **23**, 3241.
14. *Сочилин В.А., Кардаш И.Е., Герасимов Г.Н.* Синтез магнийорганических комплексов и соединений в матрице полициан-*n*-ксилилена при соконденсации циан-*n*-ксилилена с магнием. — Высокомолек. соед. 1995, **37**, 1938.
15. *Gardenas T. G., Klabunde K.J., Habe Das H.* Colloidal metal particles dispersed in monomeric and polymeric styrene and methyl methacrylate. — Chem. Matt. 1989, **1**, 481.
16. *Gárdenas T. G., Retamal C. C., Klabunde K.J.* Synthesis and molecular weights of metal poly (methyl methacrylates). — Polymer Bull. (Berlin) 1991, **25**, 315.
17. *Gárdenas G.T., Mumoz D C.* Synthesis and molecular weights of metal poly (vinyl acetate)s, 5. — Makromol. Chem. 1993, **194**, 3377.
18. *Кабанов В.А., Сергеев Г.Б., Зубов В.П., Каргин В.А.* Исследование полимеризации в системе акрилонитрил-магний, полученной конденсацией молекулярных пучков, методом электронного парамагнитного резонанса. — Высокомолек. соед. 1959, **1**, 1859.
19. *Gerasimov G.N., Dolotov S.M., Abkin A.D.* Solid-state photosensitized polymerization of acrylonitrile at cryogenic temperatures. — Radiat. Phys. Chem. 1980, **15**, 405.
20. *Chachaty C., Magat M.* Polymérisation du formaldehyde amorcée par les radiations ionisantes. — J. Polymer Sci. 1960, **48**, 139.
21. *Герасимов Г.Н., Абкин А.Д.* Фотополимеризация и фотоконденсация в твердой фазе при низких температурах. — Хим. физика 1984, **3**, 162.
22. *Mansueto E.S., Wight Ch.A.* Excited-state proton-transfer polymerization of amorphous formaldehyde. — J. Amer. Chem. Soc. 1989, **111**, 1900.

23. Александрова Л.Н., Шундина Л.В., Герасимов Г.Н., Кардаш И.Е. Низкотемпературная фотополимеризация твердого *p*-ксилилена. — *Высокомолек. соед.* 1993, **35**, 361.
24. Gerasimov G.N., Sochilin V.A., Chvalun S.N., Volkova L.V., Kardash I. Ye. Cryochemical synthesis and structure of metal-containing poly(*p*-xylylenes): system poly(chloro-*p*-xylylene)-Ag. — *Macromol. Chem. and Physics* 1996, **197**, 1387.
25. Semenov N.N. Collective interactions in polymerization processes at low temperatures and in polymers with conjugated bonds. — *J. Polymer Sci.* 1961, **55**, 563.
26. Goldanskii V.I. Facts and hypotheses of molecular chemical tunneling. — *Nature* 1979, **279**, 109.
27. Тимашев С.Ф., Трахтенберг Л.И. Классический надбарьерный механизм низкотемпературного предела скорости химических реакций. — *Ж. физ. химии* 1993, **67**, 209.
28. Basilevsky M.V., Gerasimov G.N., Petrochenko S.I., Tikhomirov V.A. Quantum-chemical investigation of the mechanism of ionic polymerization in crystals. — *Chem. Phys.* 1981, **55**, 259.
29. Hopf H. [2.2.]Paracyclophanes in polymer chemistry and materials science. — *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, **47**, 9808.
30. Герасимов Г.Н., Григорьев А.Е., Воронцов П.С., Завьялов С.А., Григорьев Е.И., Трахтенберг Л.И. Влияние света и адсорбции газов на электропроводность наногетерогенных металл-полимерных материалов. — *Хим. физика*, 1998, **17**, 1247.
31. Hopf H., Gerasimov G.N., Chvalun S.N., Rosenberg V.I., Popova E.L., Nikolaeva E.V., Grigoriev E.I., Zavyalov S.A., Trakhtenberg L.I. Metal-containing polymers: cryochemical synthesis, structure, and physicochemical properties. — *Adv. Materials. Chem. Vap. Depos.* 1997, **3**, 197.
32. Gerasimov G.N., Popova E.L., Nikolaeva E.V., Chvalun S.N., Grigoriev E.I., Rosenberg V.I., Hopf H., Trakhtenberg L.I. Ge? and Sn?containing poly(*p*?xylylene): synthesis, structure and thermal behavior. — *Macromol. Chem. Phys.* 1998, **199**, 2179.
33. Sergeev G., Zagorsky V., Petrukhina M. Nanosize metal particles in poly (*p*-xylylene) films obtained by low-temperature codeposition. — *J. Mater. Chem.* 1995, **5**, 31.
34. Alexandrova L.N., Sochilin V.A., Gerasimov G.N., Kardash I.E. Cryochemical synthesis of Mg-containing poly (*p*-xylylene). — *Polymer* 1997, **38**, 721.
35. Alexandrova L., Sansores E., Martinez E., Rodrigez E., Gerasimov G. The metal nature effects in cryopolymerized metalated poly-*p*-xylylene. — *Polymer* 2001, **42**, 273.
36. Trakhtenberg L.I., Gerasimov G.N., Aleksandrova L.N., Potapov V.K. Photo and radiation cryochemical synthesis of metal-polymer films: structure, sensor and catalytic properties. — *Radiation Physics & Chemistry* 2002, **65**, 479.
37. Арест-Якубович А.А., Басова Р.В., Бирман Е.А. Исследование полярности связи в активных центрах анионной полимеризации, содержащих металлы группы II. — *Высокомолек. соед.* 1979, **B21**, 226.
38. Ebel H.F., Wagner B.O. Ionisation von Organomagnesium?Verbindungen, III. UV-Spektroskopischer Nachweis des carbanionoiden Charakters in Äther gelöster benzyllischer Organomagnesium Verbindungen. — *Chem. Ber.* 1971, **104**, 307.
39. Weiss E. Die kristallstruktur des dimethylmagnesiums. — *J. Organometallic Chem.* 1964, **2**, 314.
40. Weiss E. Die kristallstruktur des diäthylmagnesiums. — *J. Organometallic Chem.* 1965, **4**, 101.
41. Alexandrova L., Likhachev D., Muhl S., Salcedo R., Gerasimov G., Kardash I. Cryochemical synthesis of Mn-containing poly(*p*-xylylene). — *J. Inorg. Organometal. Polym.* 1998, **8**, 157.
42. Trakhtenberg L.I., Gerasimov G.N., Grigoriev E.I., Grigoriev A.E., Kardash I.E., Radzig S.V., Vorontsov P.S., Zavyalov S.A. New nano-composite metal-polymer materials: Dielectric

- behavior. — Proceedings of Second Int. Conf. on Low Temperature Chemistry, Eds. J.R. Durig, and K.J. Klabunde, Bk Mk Press, 1996, p. 211.
43. Герасимов Г.Н., Николаева Е.В., Смирнова Е.И., Сочилин В.А., Трахтенберг Л.И. Влияние концентрации металла и структуры матрицы на формирование наночастиц серебра при криохимическом синтезе полимерных композитов. — Докл. РАН 2001, **380**, 184.
  44. Olsen A. W., Kafafi Z.H. Gold cluster-laden polydiacetylenes: novel materials for nonlinear optics. — J. Am. Chem. Soc. 1993, **113**, 7758.
  45. Сергеев Г.Б. Нанохимия, Москва, МГУ, 2003 — 288 стр.
  46. Charle K.P., Frank F., Schulze W. The optical properties of silver microcrystallites in dependence on size and the influence of the matrix environment. — Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 1984, **88**, 350.
  47. Carotenuto C., Pepe G.P., Nicolais L. Preparation and characterization of nano-sized Ag/PVP composites for optical applications. — Eur. Phys. J. B 2000, **16**, 11.
  48. Kreibig U., Fragstein C. The limitation of electron mean free path in small silver particles. — Z. Physik 1969, **224**, 307.
  49. Genzel L., Martin T.P., Kreibig U. Dielectric function and plasma resonances of small metal particles. — Z. Physik B 1975, **21**, 339.
  50. Apell P., Ljungbert A. Red shift of surface plasmons in small metal particles. — Solid State Commun. 1982, **44**, 1367.
  51. Бутуева Г.В., Загорский В.В., Зиненкова Г.М., Петрухина М.А., Ревокатов О.П., Сергеев Г.Б. Электронно-микроскопическое исследование наночастиц в полипарацисилилене. — Известия РАН. Сер. физ. 1997, **61**, 1871.
  52. Nikolaeva E.V., Ozerin S.A., Grigor'ev A.E., Grigor'ev E.I., Chvalun S.N., Gerasimov G.N., Trakhtenberg L.I. Formation, structure and photoelectrical properties of poly-p-xylylene-PbS semiconductor nanocomposite films. — Mater. Science and Eng. C, 1999, **8-9**, 217.
  53. Трахтенберг Л.И., Рабинович А.Б., Каминский В.А., Герасимов Г.Н. Кинетика формирования металл-полимерных нанокомпозитных пленок. — Хим. физика 2002, **21**, 69.
  54. Song H., Ilegbusi O.J., Trakhtenberg L.I. Modeling vapor deposition of metal/semiconductor-polymer nanocomposite. — Thin Solid Films 2005, **476**, 190.
  55. Ilegbusi O.J., Iguchi M., Wahnsiedler W. Mathematical and Physical Modeling of Materials Processing Operations. — New York: Chapman & Hall/CRC, 1999.
  56. Озерин С.А. Синтез, структура и свойства гибридных нанокомпозитов на основе серебра, сульфида свинца и поли-п-ксилилена. — Автореферат диссертации. Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН 2005 г.
  57. Николаева Е.В. Синтез, структура и свойства поли-п-ксилиленовых композитных пленок с металлическими и полупроводниковыми частицами. Автореферат диссертации. НИФХИ им. Л.Я. Карпова. 2000 г.
  58. Godovski D. Yu. Electron Behavior and Magnetic Properties Polymer-Nanocomposites. — Adv. Polymer Sci. 1995, 119.
  59. Замираев К.И., Хайрутдинов Р.Ф., Жданов В.П. Туннелирование электрона в химии. Новосибирск, Наука. 1985 г. — 312 стр.
  60. Wang Y., Herron N. Nanometer-sized semiconductor clusters: materials synthesis, quantum size effects, and photophysical properties. — J. Phys.Chem. 1991, **95**, 525.
  61. Sergeev G., Zagorsky V., Petrukhina M., Zav'yalov S., Grigor'ev E., Trakhtenberg L. Preliminary study of the interaction of metal nanoparticle-containing poly-p-xylylene films with ammonia. — Anal. Commun. 1997, **34**, 113.
  62. Trakhtenberg L.I., Axelrod E., Gerasimov G.N., Grigor'ev A.E., Grigor'ev E.I., Zav'yalov S.A., Feldman Yu. Sensor properties, photoconductivity and dielectric behaviour of poly-p-

- xylylene films containing semiconductor nanocrystals. — *Sci. Isr. — Technol. Adv.* 1999, **1**, 34.
63. *Воронцов П.С., Герасимов Г.Н., Голубева Е.Н., Григорьев Е.И., Завьялов С.А., Завьялова Л.М., Трахтенберг Л.И.* Газочувствительные и каталитические свойства ансамбля взаимодействующих наночастиц палладия. — *Ж. физ. химии* 1998, **72**, 1912.
64. *Cobden P.D., Nieuwenhuys B.E., Gorodetskii V.V.* Adsorption of some small molecules on a Pd field emitter. — *Applied Catalysis A* 1999, **188**, 69.
65. *Scheep L.R., Pert A., Feltar P.* Spin-dependent tunneling with Coulomb blockade. — *Phys. Rev. B* 1997, **56**, 5747.
66. *Fugimori B., Mitani S., Ohnuma S.* Spin-dependent tunneling effect and GMR in metal-nonmetal granular systems. — *J. Appl. Phys.* 1996, **79**, 4733.
67. Синтез, строение и свойства металл/полупроводник содержащих наноструктурированных композитов / под редакцией Л.И. Трахтенберга, М.Я. Мельникова. — Москва, Техносфера, 2016. — 624 с.
68. *Trakhtenberg L.I., Axelrod E., Gerasimov G.N., Nikolaeva E.V., Smirnova E.I.* New nanocomposite metal-polymer materials: dielectric behavior. — *J. Non-crystalline solids* 2002, **305**, 190.
69. *Feldman Yu., Kozlovich N., Nir I., Garti N.* Dielectric relaxation in sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate-water-decane microemulsions near the percolation temperature threshold. — *Phys. Rev. E* 1995, **51**, 478.
70. *Gutina A., Axelrod E., Puzenko A., Rysiakiewicz-Pasek E., Kozlovich N., Feldman Yu.* Dielectric relaxation of porous glasses. — *J. Non-Cryst. Solids* 1998, **302**, 235.
71. *Dielectric Relaxation in Biological Systems. Physical Principles, Methods, and Applications*, Ed. by V. Raicu and Yu. Feldman, Oxford University Press, Oxford (2015).
72. *Havriliak S., Negami S.* A complex plane representation of dielectric and mechanical relaxation processes in some polymers. — *Polymer* 1967, **8**, 161.
73. *Trakhtenberg L.I., Gerasimov G.N., Grigoriev E.I., Zav'yalov S.A., Zagorskaya O.V., Zufman V. Yu., Smirnov V.V.* A complex plane representation of dielectric and mechanical relaxation processes in some polymers, in: Delmon B. and Yates J. T., ed., *Studies in Surface Science and Catalysis*, Adv. Elsevier, Amsterdam, 2000, vol. 130, 12th ICC, Part B, p. 941.
74. *Becker C., Henry C.R.* Cluster size dependent kinetics for the oxidation of CO on a PdMgO (100) model catalyst. — *Surf. Sci.* 1996, **352–354**, 457.
75. *Назаев Э.Л.* Малые металлические частицы. — *Успехи физических наук* 1992, **162**, №9, 49.
76. *Эфрос А.Л.* Физика и геометрия беспорядка. — М., Наука, 1982. — 176 стр.
77. *Alves M.C.M., Tourillon G.* Influence of complexation processes on the catalytic properties of some polymer-based cobalt compounds for oxygen electroreduction. — *J. Phys. Chem.* 1996, **100**, 7566.
78. *Zare Y., Shabani I.* Polymer/metal nanocomposites for biomedical applications. — *Mat. Sci. Eng. C* 2016, **60**, 195.
79. *Williams D.H., Bardsley B.* The vancomycin group of antibiotics and the fight against resistant bacteria. — *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, **38**, 1172.
80. *Tamayo L.A., Zapata P.A., Vejar N.D., Azócar M.I., Gulppi M.A., Zhou X., Thompson G.E., Rabaglia F.M., Páez M.A.* Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes*. — *Mat. Sci. Eng. C* 2014, **40**, 24.
81. *Kneipp K., Kneipp H., Itzkan I., Dasari R.R., Feld M.S.* Surface-enhanced Raman scattering and biophysics. — *Phys.: J. Condens. Matter* 2002, **14**, R597.

82. *Cioffi N., Torsi L., Ditaranto N., Sabbatini L., Zambonin P.G., Tantillo G., Ghibelli L., D'Alessio M., Bleve-Zacheo T., Traversa E.* Antifungal activity of polymer-based copper nanocomposite coatings. — *Appl. Phys. Lett.* 2004, **85**, 2417.
83. *Cioffi N., Torsi L., Ditaranto N., Tantillo G., Ghibelli L., Sabbatini L., Bleve-Zacheo T., D'Alessio M., Zambonin P. G., Traversa E.* Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. — *Chem. Mater.* 2005, **17**, 5255.
84. *Anyagou K.C., Fedorov A.V., Neckers D.C.* Synthesis, characterization, and antifouling potential of functionalized copper nanoparticles. — *Langmuir* 2008, **24**, 4340.
85. *España-Sánchez B.L., Ávila-Orta C.A., Padilla-Vaca F., Neira-Velázquez M.G., González-Morones P., Rodríguez-González J.A, Hernández-Hernández E., Rangel-Serrano Á, Yate L, Ziolo R.F.* Enhanced antibacterial activity of melt processed poly(propylene) Ag and Cu nanocomposites by argon plasma treatment plasma process. — *Polym.* 2014, **11**, 353.
86. *Zapata P.A., Tamayo L., Páez M., Cerda E., Azócar I., Rabagliati F.M.* Nanocomposites based on polyethylene and nanosilver particles produced by metallocenic  $\eta$ -*in situ* polymerization: synthesis, characterization, and antimicrobial activity. — *Eur. Polym. J.* 2011, **47**, 1541.
87. *Shabani I., Haddadi-Asl V., Soleimani M., Seyedjafari E., Hashemi S.M.* Ion-exchange polymer nanofibers for enhanced osteogenic differentiation of stem cells and ectopic bone formation. — *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2013, **6**, 72.
88. *Shabani I., Hasani-Sadrabadi M.M., Haddadi-Asl V., Soleimani M.* Nanofiber-based polyelectrolytes as novel membranes for fuel cell applications. *J. Membr. Sci.* 2011, **368**, 233.
89. *Faupel F., Zaporozhchenko V., Strunskus T., Elbahri M.* Metal/polymer nanocomposites for functional applications. — *Adv. Eng. Mat.* 2010, **12**, 1177.
90. *Zaporozhchenko V., Podschun R., Schurmann U., Kulkarni A., Faupel F.* Physico-chemical and antimicrobial properties of co-sputtered Ag-Au/PTFE nanocomposite coatings. — *Nanotechnology* 2006, **17**, 4904.
91. *Kumar R., Mnsted H.* Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. — *Biomaterials* 2005, **26**, 2081.
92. *Fleischmann M., Hendra P.J., McQuillan A.J.* Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. — *Chem. Phys. Lett.*, 1974, **26**, 163.
93. *Набиев И.Р., Ефремов Р.Г., Чуманов Г.Д.* Гигантское комбинационное рассеяние и его применение к изучению биологических молекул. — *Успехи физ. наук* 1988, **154**, 459.
94. *Kao P., Malvadkar N.A., Cetinkaya M., Wang H., Allara D. L., Demirel M.C.* Surface-enhanced Raman detection on metalized nanostructured poly(p-xylylene) films. — *Adv. Mater.* 2008, **20**, 3562.
95. *Емельянов В.И., Коротеев И.И.* Эффект гигантского комбинационного рассеяния света молекулами, адсорбированными на поверхности металла. — *Успехи физ. наук* 1981, **135**, 345.
96. *Moskovits M.* Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals. — *J. Chem. Phys.* 1978, **69**, 4159.
97. *Pursel S., Horn M.W., Demirel M.C., Lakhtakia A.* Growth of sculptured polymer sub-micronwire assemblies by vapor deposition. — *Polymer* 2005, **46**, 9544.
98. *Shanmukh S., Jones L., Driskell J., Zhao Y., Dluhy R., Tripp R.A.* Rapid and sensitive detection of respiratory virus molecular signatures using a silver nanorod array SERS substrate. — *Nano Lett.* 2006, **6**, 2630.
99. *Malvadkar N., Demirel G., Poss M., Javed A., Dressick W.J., Demirel M.C.* Fabrication and use of electroless plated polymer surface-enhanced Raman spectroscopy substrates for Viral Gene detection. — *J. Phys. Chem. C* 2010, **114**, 10730.

100. Wang H., Malvadkar N., Koytek S., Bylander J., Reeves W.B., Demirel M.C. Quantitative analysis of creatinine in urine by metalized nanostructured parylene. — *J. Biomedical Optics* 2010, **15**, 027004.
101. Завьялов С.А., Завьялова Л.М., Трахтенберг Л.И., Григорьев Е.И., Буянов В.М., Телешов Б.В., Ковалев А.И., Мильчаков А.А., Лащманов С.Г. Определение антиоксидантного потенциала биологических жидкостей с помощью полупроводниковых химических сенсоров. — *Вестник Мед АН РФ*, 1998, № 7, 55.
102. Trakhtenberg L.I., Gerasimov G.N., Gromov V.F., Belysheva T.V. Ilegbusi O.J. Effect of composition and temperature on conductive and sensing properties of CeO<sub>2</sub> – In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite films, *Sensors and Actuators B* 2015, **209**, 562.
103. Gerasimov G.N., Gromov V.F., Ilegbusi O.J., Trakhtenberg L.I. The mechanisms of sensory phenomena in binary metal-oxide nanocomposites, *Sensors and Actuators B* 2017, **240**, 613.
104. Brauman J.I. Clusters. — *Science* 1996, **271**, 889.



## Глава II |

### Магнитные наночастицы в медицине

*Верная О.И.<sup>1</sup>, Шабатин В.П.<sup>1</sup>, Шабатина Т.И.<sup>1</sup>, Мельников М.Я.<sup>1</sup>*

Магнитные наночастицы представляют собой класс наночастиц, которыми можно манипулировать с помощью магнитных полей. Они состоят из магнитных элементов, таких как железо, никель, кобальт, хром, марганец, гадолиний, их химических соединений и сплавов.

Физические и химические свойства магнитных наночастиц в значительной степени зависят от их кристаллической структуры, размера, формы и составляющих химических компонентов. Помимо свойств, общих для наноматериалов, магнитные наночастицы также обладают специфическими магнитными свойствами, такими как суперпарамагнетизм, высокая коэрцитивная сила, низкая температура Кюри и высокая магнитная восприимчивость [1].

Суперпарамагнетизм — форма магнетизма, проявляющаяся у ферромагнитных и ферримагнитных частиц. Если такие частицы достаточно малы (150 нм и менее, точная величина зависит от химического состава частицы), то они переходят в однодоменное состояние, то есть становятся равномерно намагниченными по всему объёму. Магнитный момент таких частиц может случайным образом менять направление под влиянием температуры, и при отсутствии внешнего магнитного поля средняя намагниченность суперпарамагнитных частиц равна нулю. Но во внешнем магнитном поле такие частицы ведут себя как парамагнетики даже при температуре ниже точки Кюри или точки Нееля. Магнитная восприимчивость суперпарамагнетиков намного больше, чем парамагнетиков.

Магнитные наночастицы широко используются в катализе, минералогии (при отборе руд), информатике (в системах хранения данных), экологии (в системах очистки), энергетике (в качестве анодов в литий-ионных аккумуляторах). В последние годы магнитные наночастицы находят все большее применение в биомедицинских сферах: перспективность их использования показана в таких направлениях как биосепарация, гипертермия, магнитная резонансная томография (МРТ), направленная доставка лекарств, тканевая инженерия.

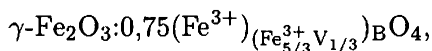
---

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет

Наночастицы оксида железа, такие как магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) или его окисленная форма маггемит ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), являются наиболее часто используемыми магнитными наночастицами для биомедицинских целей в силу их невысокой стоимости, низкой токсичности, биосовместимости и биоразлагаемости [2]. Наночастицы кобальта и никеля подвержены окислению и токсичны, поэтому они значительно менее привлекательны для использования в медицине. Склонность к окислению наночастиц железа ограничивает их биомедицинское применение. В последние несколько лет в качестве возможных «соперников» оксидов железа рассматриваются смешанные оксиды со структурой шпинели, аналогичной магнетиту и маггемиту ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ), благодаря их улучшенным магнитным свойствам, таким как коэрцитивность и анизотропия. Однако данные соединения обладают и более высокой токсичностью, поэтому их использование для биомедицинских целей ограничено [3, 4].

Магнетит,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  — ферримагнетик, имеющий структуру обращенной шпинели с гранцентрированной кубической (ГЦК) элементарной ячейкой (8 молекул на элементарную ячейку) и параметром решетки  $a = 0,839$  нм. Ячейка основана на 32 ионах кислорода ( $\text{O}^{2-}$ ), расположенных вдоль кристаллографического направления (111), которые образуют октаэдрические и смешанные тетраэдрические/октаэдрические слои. Магнетит содержит ионы железа  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$ . Его структура записывается как  $\text{Fe}_A^{3+}(\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+})_B\text{O}_4$ , где половина ионов  $\text{Fe}^{3+}$  занимает тетраэдрические пустоты (А) и окружена четырьмя атомами кислорода, тогда как смесь ионов  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  занимает октаэдрические пустоты (В) и окружена шестью атомами кислорода. Ионы  $\text{Fe}^{3+}$  позиций А и В связаны антиферромагнитно, тогда как ионы  $\text{Fe}^{2+}$ , находящиеся на В-позиции, определяют макроскопические ферромагнитные свойства. Магнетит обладает довольно высокой электропроводностью (по этому параметру он приближен к металлам). Проводимость  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  возникает из-за быстрого перемещения электронов между ионами  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$ , находящимися в октаэдрических пустотах (В) [5].

Маггемит,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  — ферримагнитный оксид, который имеет структуру шпинели, близкую к структуре магнетита. Элементарная ячейка маггемита состоит из 32  $\text{O}^{2-}$ , которые образуют кубическую плотноупакованную структуру, тогда как  $\text{Fe}^{3+}$  неравномерно распределены между тетраэдрическими и октаэдрическими пустотами. В отличие от структуры  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в структуре маггемита имеется вакансия двухвалентного железа. Структура маггемита может быть записана как:



где V представляет вакансию  $\text{Fe}^{2+}$ , находящуюся в октаэдрических позициях. Элементарная ячейка маггемита ( $a = 0,8347$  нм) чуть меньше ячейки

ки магнетита из-за образования катионных вакансий и меньшего размера ионов  $\text{Fe}^{3+}$  по сравнению с ионами  $\text{Fe}^{2+}$ . Маггемит следует рассматривать как полностью окисленный магнетит и как полупроводник *n*-типа с запрещенной зоной 2,0 эВ [6].

## 11.1. Токсичности наночастиц магнетита и маггемита

Магнитные наночастицы оксидов железа привлекают к себе большое внимание не только из-за их суперпарамагнитных свойств, но также потому, что обладают низкой токсичностью для организма человека [7]. Исследование, в котором сравнивалась токсичность наночастиц оксидов различных металлов ( $\text{CuO}$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) *in vitro*, показало, что оксиды железа магнетит и маггемит не цитотоксичны в концентрациях менее 100 мкг/мл [8]. Другие исследования *in vitro* в зависимости от типа тест-клеток и наличия оболочки у наночастиц оксидов железа (поверхностно-активное вещество или полимер) показывают, что граница токсичности наночастиц железа находится в диапазоне концентраций 10–1000 мкг/мл [9–11].

При создании и применении препаратов на основе суперпарамагнитных наночастиц оксидов железа необходимо принимать во внимание возможные процессы, лежащие в основе их токсичности, поскольку наночастицы оксидов железа имеют большую площадь поверхности, содержащую активаторы (ионы металла переменной валентности), приводящие к образованию активных форм кислорода (АФК): гидроксильного радикала  $\text{OH}\cdot$ , супероксид-анион радикала  $\text{O}_2\cdot^-$ , перекиси водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Впоследствии АФК усваиваются в клетках, где они могут вызывать окислительный стресс, активируя противовоспалительные медиаторы. Кроме того, АФК в результате реакции с макромолекулами может повредить клетки путем перекисного окисления липидов, изменения белков, повреждения генетических материалов, нарушения функций передачи сигналов и модуляции транскрипции генов, что в конечном итоге приводит к гибели клеток в результате некроза или апоптоза [12].

Кроме того, необходимо учитывать, что хотя доза оксидов железа, вводимая, например, внутривенно, составляет 1,25–5% от общего запаса железа в организме, магнитное нацеливание на конкретный орган оксидов железа для получения максимальной пользы от лечения или диагностики приводит к их высоким концентрациям в целевых органах. Следовательно, эта локальная перегрузка железом может привести к высоким уровням концентрации свободных ионов железа в ткани и вызвать aberrантные клеточные реакции, такие как цитотоксичность, окислительный стресс,

воспалительные процессы. Это воздействие может приводить к повреждению ДНК, которое может инициировать канцерогенез или оказывать значительное влияние на генетику будущих поколений, если верность генома в половых клетках не поддерживается. Действительно, избыток железа после внутримышечных инъекций железо-декстринового комплекса, согласно литературным данным, приводит к саркоме веретенообразных клеток и плеоморфной саркоме у крыс [13]. Возможно, что эти новообразования являются результатом явления, известного как твердотельный канцерогенез, посредством которого имплантация инородного тела (в данном случае оксидов железа) приводит к образованию опухоли [14].

Исследование на мышах показало, что подкожная инъекция суперпарамагнитных наночастиц оксидов железа в дозе 100 мг/кг показывает низкую токсичность (без смертельных исходов, серьезного лечения и с легкими клиническими признаками). Установлено, что введенные частицы распределяются в головном мозге, сердце, печени, легких, почках и селезенке в течение 24 часов после инъекции. После цикла инъекций в течение 10 дней отложение железа в исследуемых органах было низким, что свидетельствует о том, что железо быстро выводится из организма.

Токсичность наночастиц оксидов железа *in vivo* зависит от места их локализации. Исследование на крысах выявило, что однократная внутривенная инъекция оксидов железа (0,8 мг/кг) крысе может стимулировать токсические эффекты в печени, легких и почках, тогда как сердце и мозг остаются практически незатронутыми. Это хорошо подтверждается другим исследованием *in vivo*, которое показало, что внутривенное введение оксидов железа в дозе 10 мг/кг у крыс усиливает окислительный стресс в печени, селезенке и почках, который достигает пика примерно через 3 дня, а затем медленно снижается. Печень возвращалась к нормальному состоянию в течение 1 недели, в то время как почкам и селезенке на это потребовалось 3 недели. Явных гистопатологических изменений в клеточных структурах печени, селезенки и почек через 1 день или 7 дней после инъекции магнитных частиц не было [15].

Число исследований *in vivo*, выполненных на людях, значительно меньше. Препарат Ferumoxtran-10 (магнитные наночастицы покрытые декстраном) вызывал только мягкие и короткие по продолжительности побочные эффекты, такие как крапивница, диарея и тошнота [16]. Считается, что это происходит главным образом потому, что оксиды железа могут разрушаться и выводятся путями метаболизма эндогенного железа. Железо, высвобождаемое из препарата, метаболизируется в печени и впоследствии используется для образования эритроцитов или выводится через почки. В настоящее время существует несколько одобренных организацией по контролю за качеством продуктов и медикаментов в США — Food

and Drug Administration (FDA) контрастных агентов для MPT (Feridex<sup>®</sup>, Endorem<sup>™</sup>, GastroMARK<sup>®</sup>, Lumirem<sup>®</sup>, Sinerem<sup>®</sup> или Resovist<sup>®</sup>) и систем магнитной доставки лекарств (MagNaGel<sup>®</sup> 32 и FluidMAG<sup>®</sup> и TargetMAG<sup>®</sup>), которые удовлетворяют действующим нормам, касающимся применения пациентами [17].

## 11.2. Синтез магнитных наночастиц оксидов железа

**Химические методы.** Одним из самых простых и наиболее распространённым методов синтеза магнитных наночастиц является *метод соосаждения*. Суть данного метода заключается в получении магнитных наночастиц из водных растворов солей трех- и двухвалентного железа в молярном соотношении 2:1 путем медленного добавления в раствор осадителя (водного раствора аммиака, гидроксида или карбоната натрия) при комнатной температуре или нагреве. Сопутствующей реакцией является реакция окисления магнетита до маггемита кислородом воздуха. Поэтому данным методом получают магнитные наночастицы, по составу промежуточные между магнетитом и маггемитом [18, 19]. Для получения преимущественно наночастиц магнетита эту реакцию исключают пропусканием аргона или азота через растворы реагентов. Методом соосаждения в зависимости от типа солей железа, природы осадителя, растворителей, контроля температуры и рН получают наночастицы магнетита размером 1–40 нм.

**Термическое разложение** является одним из наиболее эффективных методов получения магнитных наночастиц с узким распределением по размерам. В частности, термическое разложение может быть достигнуто с помощью двух разных протоколов, а именно «нагревание-вверх» и «горячий впрыск». Процесс «нагревания-вверх» подразумевает непрерывный нагрев раствора, состоящего из соединений-предшественников, поверхностно-активных веществ и растворителя до заданной температуры, при которой наночастицы начинают кластеризоваться и расти. Наоборот, метод «горячей инъекции» вызывает быстрое и гомогенное зародышеобразование путем введения реагентов в горячий раствор поверхностно-активного вещества с последующей контролируемой фазой роста. В любом случае оба процесса основаны на одном и том же принципе, заключающемся в нагревании немагнитного металлоорганического соединения-предшественника в присутствии органических растворителей и поверхностно-активных веществ [18]. Соединениями-предшественниками являются ацетилацетонат железа (III) и стеараты железа (II, III), в качестве ПАВ используются жирные кислоты. Аргон используется для поддержания инертной атмосферы.

ры. Оптимальная температура, необходимая для этой реакции, находится в диапазоне от 100 до 350°C, что приводит к образованию кристаллических магнитных наночастиц размером от 4 до 30 нм в диаметре с узким распределением по размерам [20]. В данном случае температура и время реакции являются важными факторами для контроля размера частиц. Термическое разложения стеаратов железа позволяет контролировать форму получаемых наночастиц (сферы, кубы, диски), которая зависит от природы и концентрации реагентов [21].

*Гидротермальный и сольвотермальный методы.* В основе гидротермального метода синтеза лежит высокая растворимость большого количества неорганических веществ в воде при повышенных температуре и давлении и возможность последующей кристаллизации растворенного материала из жидкой фазы [22–24]. Высокие температуры способствуют быстрому зародышеобразованию под воздействием осадителей. Сольвотермальный метод отличается от гидротермального тем, что в качестве растворителя используют не воду, а органические растворители. Данные методы подразумевают использование автоклавов для того, чтобы создать и поддерживать повышенную температуру (130–250°C) и давление (0,3–4 Мпа). Предшественниками служат соли двух- и трехвалентного железа. В качестве осадителей используются растворы гидроксида натрия, тетраметиламмоний гидроксида, гидразина. Также для нагрева смеси может использоваться микроволновое излучение, тогда говорят о гидротермально-микроволновом или сольвотермально-микроволновом методе. Как правило, форма, размер частиц и распределение по размерам зависят от концентрации предшественника, выбранной для синтеза реакции, времени и температуры процесса. Размеры получаемых наночастиц обычно находятся в диапазоне от 10 до 50 нм. Короткие времена автоклавирования позволяют получить монодисперсные частицы.

*Полиоольный синтез* представляет собой метод, в котором многоатомный спирт или смесь спиртов, используется в качестве растворителя или в качестве растворителя и восстановителя. Полиэтиленгликоль в полиоольном синтезе наночастиц магнетита взаимодействует с солью трехвалентного железа, в данном случае он является не только растворителем, но и восстановителем, осадителем и стабилизатором [25]. Другой полиоольный синтез наночастиц маггемита со средним размером 11 нм основан на окислительном щелочном гидролизе солей  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  в полиосмеси (полиэтиленгликоль/ диэтиленгликоль или N-метилдиэтаноламин)) [26]. Синтез наночастиц гидрофильного магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) может быть проведен путем термоллиза ацетилацетоната железа (III) в четырех различных жидких полиоолах: диэтиленгликоле, триэтиленгликоле, тетраэтиленгликоле и по-

лиэтиленгликоле. Средний размер частиц в зависимости от используемого полиола варьируется от 7 до 15 нм [27].

*Метод микроэмульсий* заключается в смешении двух микроэмульсий (вода/ПАВ/неорганический растворитель), содержащих водный раствор солей железа и реагента осадителя. При смешивании двух микроэмульсий с растворенными в них реагентами для образования оксида железа формируются наночастицы магнетита (частично окисленного до маггемита), размер которых (1-50 нм) можно контролировать размером мицелл. Преимуществом метода является узкое распределение по размерам получаемых наночастиц. К недостаткам метода относится сложность очистки от ПАВ и сравнительно небольшие количества получаемых наночастиц.

Наночастицы магнетита могут быть получены окислением наночастиц железа [28]. Наночастицы маггемита получают окислением наночастиц железа и магнетита кислородом воздуха при 300°C. Более высокие температуры использовать нецелесообразно в связи с укрупнением наночастиц оксида железа за счет спекания, а также в связи с переходом термодинамически неустойчивой полиморфной модификации оксида железа (III) — маггемита ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) в гематит ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) в диапазоне температур от 300 до 500°C.

*Физические методы* получения магнитных наночастиц можно разделить на процедуры «сверху вниз» и «снизу вверх». Методы «сверху вниз» основаны на уменьшении размера макроскопических магнитных материалов до нанометрового диапазона за счет измельчения в мельницах. Основным недостатком этих методов является трудность регулировки размера и формы частиц. Кроме того, процедура измельчения приводит образованию дефектов кристаллической решетки, которые вызывают отклонения в магнитных свойствах по сравнению с обычными частицами того же размера [29]. Наночастицы оксидов железа методом «снизу вверх» получают лазерным испарением. Исходными материалами являются порошки оксидов металлов с размером частиц несколько микрон, которые испаряются с помощью лазера. В результате резкого температурного градиента за пределами зоны испарения происходит очень быстрая конденсация и зародышеобразование из газовой фазы, и образуются наночастицы с размером от 20 до 50 нм [30, 31].

*Биологические методы.* Посредством биоминерализации некоторые живые организмы способны получать магнитные частицы [32, 33]. Магнитотактические бактерии ориентируются и мигрируют вдоль линий геомагнитного поля. Эта способность основана на внутриклеточных магнитных структурах, магнитосомах, которые содержат нанометровые мембранные кристаллы магнетита, покрытые белком. Образование магнитосом достигается путем процесса минерализации с биологическим контролем накоп-

ления железа и осаждением минеральной частицы с определенным размером, и ориентацией в мембранном пузырьке в определенных местах в клетке. В условиях анаэробного синтеза в лаборатории аналогичных условиям обитания магнитотактических бактерий, могут быть получены однородные частицы с диаметром ядра от 20 до 45 нм. Несмотря на то что магнитосомы демонстрируют превосходные магнитные свойства для медицинского применения (особенно для гипертермии), они до сих пор не нашли применения в медицине из-за своего бактериального белкового покрытия [34].

### 11.3. Биомедицинское применение магнитных оксидов железа

**Методы магнитной биосепарации.** Магнитная биосепарация — метод разделения, в котором биологические объекты, прикрепленные к поверхности наноматериалов с магнитной восприимчивостью, извлекаются из их биологической среды с использованием внешнего магнитного поля. В настоящее время для биосепарации используются суперпарамагнитные наночастицы оксидов железа, поскольку они легко намагничиваются под действием внешнего магнитного поля в магнитном сепараторе. После удаления внешнего магнитного поля, биоэлементы, захваченные с помощью суперпарамагнитных наночастиц, снова диффундируют в растворы. Метод магнитной биосепарации широко используется при разделении и очистке биологических объектов различных типов, например клеток, бактерий, белков и нуклеиновых кислот.

**Магнитная сепарация белков.** Традиционные методы разделения белков, такие как метод осаждения в органическом растворителе, метод высушивания, метод мембранного разделения и хроматография, обычно требуют изменения некоторых параметров, например диэлектрической проницаемости, pH, температуры и ионной силы и т. д. Они трудоемки и в ходе их осуществления целевые белки могут быть повреждены. Аффинная хроматография является одним из наиболее важных методов выделения белков. Однако недостатком всех стандартных процедур жидкостной хроматографии на колонках является невозможность стандартных систем колонок справляться с образцами, содержащими твердые частицы. В последнее время появилось много методов, которые объединяют магнитные наночастицы с традиционными способами разделения и очистки для разделения различных типов белка. Методы магнитного разделения имеют ряд преимуществ по сравнению со стандартными процедурами разделения. Этот процесс обычно очень прост. Все этапы процедуры очистки могут проходить в одной пробирке. Нет необходимости в дорогих жидкостных хрома-



тографических системах, центрифугах, фильтрах или другом оборудовании. Процесс разделения можно проводить непосредственно в неочищенных образцах, содержащих взвешенный твердый материал. В некоторых случаях (например, выделение внутриклеточных белков) можно даже объединить этапы дезинтеграции и разделения и, таким образом, сократить общее время разделения [35]. Магнитное разделение обычно очень мягкое для целевых белков или пептидов. Даже крупные белковые комплексы, которые, как правило, разрушаются традиционными методами колоночной хроматографии, могут оставаться неизменными при использовании этой процедуры.

Частицы с иммобилизованными аффинными лигандами используются для магнитной аффинной адсорбции. Стрептавидин, антитела, белок А и белок G чаще всего используются при выделении белка и пептидов. Магнитные частицы с вышеупомянутыми иммобилизованными лигандами также могут служить в качестве общих твердых фаз, в которые могут быть иммобилизованы модифицированные аффинные лиганды (например, антитела в случае иммобилизованного белка А, белок G или вторичные антитела, биотинилированные молекулы в случае иммобилизованного стрептавида).

Для иммобилизации лигандов используются стандартные процедуры, используемые в аффинной хроматографии: поверхность неорганических частиц модифицируют таким образом, чтобы на ней появились доступные функциональные группы, которые обеспечивают легкую иммобилизацию аффинных лигандов, такие как  $-COOH$ ,  $-OH$  или  $-NH_2$ . Для этого поверхность магнетита (или аналогичных магнитных материалов, таких как маггемит или ферриты) модифицируют методом силанизации. Кроме того, используются инкапсулированные частицы, имеющие внешний слой из биосовместимого полимера. Для приготовления таких частиц используют биополимеры, например, агарозу, хитозан, каппа-каррагинан и альгинат. Самый простой способ приготовления магнитных полимерных частиц заключается в том, что раствор биополимера смешивают с магнитными частицами, и образовавшийся объемный магнитный гель механически разбивается на мелкие частицы. В качестве альтернативы используется метод суспензии вода-в-масле для приготовления сферических частиц.

*Магнитная сепарация клеток* представляет большой интерес в клинической диагностике, биоинженерии и пищевой инженерии. В данном методе используют суперпарамагнитные наночастицы, покрытые антителами против поверхностных антигенов клеток. В отличие от традиционного разделения клеток, их магнитное разделение имеет очевидные преимущества [36, 37]:

- целевые клетки легко отделяются от образцов крови, костного мозга, измельченных тканей или питательных сред;
- отделению не мешают примесные ионы или ионы растворителей;
- данный метод не приводит к разрушению отделяемых клеток.

Этот метод подходит для обнаружения прокариотических организмов, таких как бактерии. Выделение специфических бактерий, связанных с магнитными наночастицами, посредством реакции антиген-антитело, как правило, осуществляется путем инокуляции образцов гранул в бульоны для культивирования или на твердую среду, селективную для бактерий-мишеней. Бактерии, иммунологически связанные с магнитными частицами, обычно остаются жизнеспособными и могут продолжать размножаться, если обеспечивается их потребность в питании. Выделенную фракцию можно затем промыть для удаления неспецифически связанных организмов, прежде чем поместить ее в подходящую среду для выращивания. Целевые бактерии отделяются от окружающей среды и концентрируются до объема, подходящего для культивирования в чашках или в бульоне. Удаление ингибирующих рост реагентов, присутствующих в образце, усиливает культивирование бактерий, связанных с магнитными частицами. К ограничениям данного метода относится присутствие антител, направленных против поверхности организма-мишени, и необходимость наличия высокой концентрации свободного антигена в клетке-мишени [38].

Метод иммуномагнитной сепарации использовался для отделения раковых клеток, лимфоцитов крови [1], *Salmonella typhimurium* [39], *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* [40], *E. coli* O157:H7 [41].

*Магнитная сепарация нуклеиновых кислот.* Разделение нуклеиновых кислот становится все более важным инструментом для молекулярной биологии. Выделение ДНК или РНК является шагом, предшествующим многим биохимическим и диагностическим процессам, таким как обнаружение, клонирование, секвенирование, амплификация, гибридизация, синтез ДНК. Присутствие больших количеств загрязняющих материалов, таких, например, как белки или углеводы препятствуют многим последующим манипуляциям. Кроме того, ДНК может загрязнять РНК и наоборот. Таким образом, способы эффективного, надежного и воспроизводимого выделения нуклеиновых кислот из сложных смесей необходимы для многих методов, которые используются сегодня и основаны на идентификации ДНК или РНК, например, диагностика микробных инфекций, криминалистика, типирование тканей и крови, выявление генетических вариаций.

До использования современных технологий отделение нуклеиновой кислоты было трудоемким процессом, основанным на нескольких стадиях экстракции и центрифугирования, часто ограниченным небольшими вы-

ходами и низкой чистотой продуктов разделения. Магнитное разделение нуклеиновых кислот имеет несколько преимуществ по сравнению с другими методами, используемыми для той же цели. Нуклеиновые кислоты могут быть выделены непосредственно из неочищенных образцов, таких как кровь, среды для культивирования, вода и т. д. Для данного метода практически нет ограничений в отношении объемов образца. Благодаря возможности регулировки магнитных свойств твердых материалов, они могут быть удалены относительно легко и избирательно даже из вязких образцов взвесей.

Магнитные носители с иммобилизованными аффинными лигандами или полученные из биополимера, проявляющего аффинность к нуклеиновой кислоте-мишени, используют для процесса выделения. Такие материалы представляют собой магнитные частицы, полученные из различных синтетических полимеров, биополимеров, пористого стекла и магнитных наночастиц на основе неорганических магнитных материалов, таких как оксид железа с модифицированной поверхностью. Особенно подходят суперпарамагнитные частицы, которые не взаимодействуют друг с другом в отсутствие магнитного поля. Эти частицы будут намагничиваться в сильном магнитном поле, но не сохраняют постоянного магнетизма, как только поле будет удалено. Методам синтеза модифицированных магнитных частиц, а также доступным коммерческим частицам, используемым для разделения нуклеиновых кислот посвящен обзор [42].

**Диагностическое применение магнитных наночастиц. Магнитно-резонансная томография (МРТ)** представляет собой метод визуализации для клинического использования, который и основан на измерении сигналов ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Эффективность МРТ можно значительно улучшить, воздействуя на свойства сигнала МР окружающих тканей контрастными веществами, которые вводят в 40–50% всех МРТ обследований. Контрастные агенты МРТ можно объединить в две группы, позитивные контрастные агенты (или контрастные агенты  $T_1$ ) и негативные контрастные агенты (контрастные агенты  $T_2$ ). Позитивные контрастные агенты могут сократить время продольной релаксации ( $T_1$ ) протонов, что приводит к более яркому изображению. Негативные контрастные агенты могут сократить поперечное время релаксации ( $T_2$ ) протонов.

В настоящее время большинство контрастных агентов МРТ на рынке представляют собой агенты на основе хелатных комплексов гадолиния (контрастные агенты  $T_1$ ), поскольку более яркое изображение клинически предпочтительнее для лучшего разрешения и легкого обнаружения. К сожалению, комплексы на основе гадолиния представляют опасность для здоровья пациентов с заболеваниями почек и печени, поскольку они

не могут быть эффективно удалены из организма таких пациентов. Кроме того, эти комплексы вызывают поражения головного мозга из-за нежелательной аккумуляции, даже у пациентов без проблем с печенью и почками. FDA выпустило общее предупреждение для всех контрастных веществ на основе гадолиния и рекомендует не применять их у всех пациентов с острой почечной недостаточностью.

По сравнению с контрастными агентами на основе гадолиния контрастные агенты на основе магнетита и маггемита ( $T_2$ ) показывают более высокую биосовместимость и безопасность. Однако для более темного изображения, полученного с помощью контрастного вещества  $T_2$ , характерно низкое разрешение и фоновые помехи. Наночастицы оксида железа имеют ограниченное клиническое применение при визуализации печени, селезенки и лимфатических узлов, поскольку они пассивно накапливались в этих местах. Поэтому в США были запрещены одобренные ранее FDA агенты для МРТ на основе наночастиц оксида железа.

Однако согласно экспериментальным исследованиям, проведенным в последние несколько лет, чрезвычайно маленькие наночастицы магнетита и маггемита размером менее 5 нм являются потенциально перспективными  $T_1$  контрастными агентами [43, 44].

*Применение магнитных наночастиц в иммуноанализе.* Для получения магнитных агентов иммуноаналитического назначения наночастицы магнитных оксидов железа связывают с широким спектром соединений (антителами, олигонуклеотидами, стрептоведином, биотином и др.). Магнитные наночастицы используются при анализе широкого спектра бактерий (*Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonasputida*, *Salmonella*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Chlamydia trachomatis* и т. п.), энтеровирусов, цитомегаловирусов, вируса иммунодефицита человека, паразитов, таких как *Plasmodium falciparum* (являющийся причиной тяжелой формы малярии) или *Schistosoma mansoni*.

Существует несколько направлений применения оксидов железа в иммуноанализе. Магнитные наночастицы с иммобилизованными иммунореагентами используются как твердая фаза иммуноанализа. Специфические антитела и антигены находятся на поверхности магнитных наночастиц, детекцию проводят с помощью ферментов, радиоизотопов, флуоресцентных маркеров или хемилюминесцентных меток. Для этого метода характерна высокая экспрессность, поскольку анализ проводится в псевдогомогенном режиме (магнитные агенты диспергированы в объеме).

Также модифицированные магнитные наночастицы служат метками, которые в дальнейшем регистрируются по оптическим (флуоресцентные

методы анализа, комбинационное рассеяние света) или магнитным (определение относительной магнитной проницаемости) свойствам [45].

При проведении иммуноанализа из пробы часто необходимо удалить компоненты, препятствующие или снижающие эффективность последующего анализа. Поэтому перед проведением анализа проба очищается или концентрируется методом магнитной сепарации с использованием магнитных частиц, а затем анализируется [46].

**Тканевая инженерия.** В последнее время магнитные наночастицы все шире используются в тканевой инженерии при разработке функциональных заменителей поврежденных тканей. Эта новая технология является многообещающим подходом для преодоления кризиса трансплантации органов, вызванного нехваткой донорских органов. Тканевая инженерия включает в себя следующие процессы:

- выделение аутологичных клеток из здоровых тканей или стволовых клеток, расширение количества клеток до необходимого;
- перенесение представляющих интерес генов в клетки для усиления или модификации клеточных функций;
- конструирование трехмерных (3D) тканеподобных структур;
- трансплантация полученных конструкций пациентам.

Несмотря на то что общая технология этих процессов в тканевой инженерии уже установлена, на каждом этапе еще есть много проблем, требующих решения. Возможность дистанционного манипулирования и управления клетками на каждом этапе может дать мощный инструмент для тканевой инженерии. Магнитные наночастицы представляют собой такой инструмент [47, 48]. Они могут быть использованы для выделения необходимых клеток методами магнитной сепарации, для доставки генов при модификации клеточных функций. Магнитные наночастицы, прикрепленные к функциональным участкам, как на клеточной мембране, так и на внутренних клеточных компонентах, могут действовать как преобразователи магнитных полей и обеспечивать неинвазивный контроль различных клеточных функций. Эти частицы также могут быть использованы для определения местоположения клеточной адгезии, то есть посева клеток на каркас или в заданную форму. В 2006-м была разработана методика построения каркаса с помощью магнитных частиц [49]. Магнитные поля применялись для позиционирования магнитных наночастиц, покрытых тромбином, в двумерных (2D) гексагональных массивах. Частицы использовали как центры нуклеации для упорядоченного роста фибрина, создавая упорядоченный каркас фибринового геля для эндотелиальных клеток.

Кроме того, магнитные частицы обладают очевидными преимуществами для применения *in vivo*. Было продемонстрировано, что эндотелиаль-

ные клетки-предшественники, которые могут способствовать ангиогенезу и реваскуляризации в ишемических участках, можно дистанционно направлять как *in vitro*, так и *in vivo*, применяя магнитное поле [50].

**Магнитная гипертермия.** Гипертермия, умеренное повышение температуры до 40–43°С, может вызывать гибель раковых клеток и усиливать эффекты лучевой и химиотерапии. Однако достижение его полного потенциала в качестве клинически значимого метода лечения было ограничено из-за его неспособности эффективно и локально нагревать злокачественные клетки. Эта проблема может быть обойдена внутривенным введением нацеленных на раковые клетки магнитных наночастиц, которые накапливаются в опухоли, с последующим применением переменного магнитного поля для повышения температуры наночастиц, расположенных в ткани опухоли. Этот целенаправленный подход позволяет локально нагревать злокачественные раковые клетки, в то же время не повреждая окружающие нормальные ткани, что потенциально повышает эффективность и безопасность гипертермии.

Наиболее часто используемыми материалами для магнитной гипертермии являются наночастицы магнетита или маггемита. Под воздействием переменного магнитного поля они выделяют тепло по двум основным механизмам: потери гистерезиса и релаксационных потерь. Гистерезисные потери возникают в больших магнитных наночастицах, которые обладают несколькими магнитными доменами. Когда такие частицы подвергаются воздействию переменного магнитного поля, ориентация магнитных моментов будет непрерывно выравниваться с направлением магнитного поля. Это приводит к разнице в энергии, которая выделяется в виде тепла. По мере уменьшения размера магнитных оксидов железа количество магнитных доменов также будет уменьшаться до тех пор, пока не останется один магнитный домен с пороговым размером приблизительно 128 нм. Ниже этого размера частицы оксидов железа становятся суперпарамагнитными, и в присутствии переменного магнитного поля тепло в основном производится Неелевской и Броуновской релаксацией. Неелевская релаксация относится к быстрым изменениям магнитного момента частицы при воздействии переменного магнитного поля. Быстрая перестройка противостоит кристаллической структуре частицы, что приводит к выделению тепла. Броуновская релаксация относится к теплу трения, генерируемому при физическом вращении частиц в поддерживающей среде, когда частицы пытаются выровнять себя с изменяющимся магнитным полем. Более подробно механизмы нагрева рассматриваются в работах [51, 52].

Магнитные наночастицы могут доставляться в опухоль посредством внутритуморозного, внутривентриального, внутриартериального, внутрисосудистого и внутривенного введения. Их пероральное введение не представ-

ляется возможным, поскольку большая часть наночастиц будет выведена из организма. Внутриопухолевое и внутрисосудистое введение локализует магнитные частицы в опухоли и может привести к эффективному нагреванию первичных опухолей. Хотя упомянутые способы введения хорошо подходят для конкретных случаев, внутривенное введение является наиболее универсальным способом доставки для самого широкого спектра онкозаболеваний. Когда магнитные частицы оксидов железа доставляются таким образом, накопление наночастиц в опухоли частично зависит от эффекта повышенной проницаемости и удержания [53]. Этот эффект обусловлен тенденцией для наночастиц преимущественно накапливаться в опухолях из-за их сосудистой сети и плохого лимфодренажа. Целевые лиганды (антитела и их фрагменты, лиганды специфических рецепторов, локализующихся на поверхности опухолевых клеток, пептиды, алтамеры), связанные с магнитными частицами, могут усилить поглощение наночастиц злокачественными клетками [54]. Их преимущественное накопление в злокачественных новообразованиях приводит к целенаправленному локальному нагреву опухолей и сохранению соседних нормальных тканей под действием переменного магнитного поля.

Несмотря на многообещающие результаты доклинических испытаний магнитной гипертермии, в этой области существует множество нерешенных проблем. К ним относится установление оптимальных пределов напряженности магнитного поля и частоты и их корреляция с длительностью лечения, токсичность магнитных наночастиц (в том числе зависимость токсичности от наличия специфических лигандов, улучшающих накопление магнитных частиц в опухолевых клетках) и определение их оптимальной концентрации в пораженном органе.

**Направленная доставка лекарств.** Одним из перспективных и стремительно развивающихся направлений современной фармакологии является адресная доставка лекарственных препаратов. Около ста лет назад в 1906 году химик и биолог Пауль Эрлих (1854–1915) ввел в научный жаргон термин «волшебная пуля». Он назвал так лекарственный препарат, который при введении в организм больного сам найдет и убьет возбудителя болезни, не нанося при этом вред здоровью пациента. С тех пор селективное воздействие фармакологических агентов на определенные клетки и ткани остается предметом многочисленных исследований. Начиная с 70-х гг. XX века изучается возможность создания систем доставки лекарств непосредственно к патологическому очагу. Такие системы представляют собой лекарственные вещества, закрепленные на носителе или включенные в капсулы и связанные с молекулами (векторами), обладающими тропностью к определенным клеткам [55, 56]. Носители откладывают начало действия лекарственного вещества до момента достижения

целевых органов или тканей, а векторы обеспечивают адресность доставки лекарственного средства в фармакологическую мишень. Существуют две стратегии адресной доставки лекарственных препаратов к поврежденным тканям: пассивное нацеливание и активное нацеливание. Пассивная доставка осуществляется системами, состоящими из лекарственных веществ и носителей, и обеспечивается за счет повышенной проницаемости капилляров в очаге поражения. Активная предполагает использование молекул-векторов в системах направленной доставки. В качестве векторов для доставки лекарственных препаратов рассматриваются гормоны, ферменты, пептиды, антитела, гликопротеиды, гликолипиды, вирусы. В качестве носителей лекарственных препаратов в настоящее время наиболее активно изучаются углеродные нанотрубки, липосомы, мицеллы, полимеры, дендримеры, фуллерены, магнитные наночастицы, нанодисперсные кремнеземы, эритроциты, лейкоциты и др.

Предлагаемые в настоящее время носители и капсулы для систем направленной доставки лекарств имеют ряд недостатков, требующих устранения. К недостаткам органических наночастиц (полимерные наночастицы, липосомы, мицеллы) относится ограниченная химическая и механическая стабильность, набухание, восприимчивость к микробиологическим атакам, недостаточный контроль над скоростью высвобождения лекарств и высокая стоимость. Полимерные наночастицы часто бывают полидисперсными, что может привести к неоднородным фармакологическим свойствам. Альтернативой является использование дендримеров, которые имеют монодисперсный характер и глобулярную морфологию. Однако основным недостатком дендримеров является их высокая стоимость. Также имеются проблемы с выведением дендримеров из организма [57]. Неорганические носители также имеют ряд недостатков. Использование фуллеренов, углеродных нанотрубок, графена и его оксида в качестве носителей вызывает сомнения в связи с их токсичностью. Использование  $\text{SiO}_2$  также вызывает вопрос в связи с тем, что силанольные группы с поверхности кремнезема взаимодействуют с поверхностью фосфолипидов мембран эритроцитов, что приводит к гемолизу. Кроме того, кремнеземы вызывают метаболические изменения, приводящие к развитию меланомы [58]. Таким образом, вопрос о выборе носителя для систем направленной доставки является основным.

Потенциальными носителями и векторами в системах направленной доставки являются и магнитные частицы. Их основные преимущества заключаются в том, что они могут быть:

- визуализированы (суперпарамагнитные наночастицы используются в качестве контрастных агентов для МРТ);
- направляться или удерживаться на месте с помощью магнитного поля;



- могут быть нагреты в магнитном поле, чтобы вызвать высвобождение лекарственного средства.

Для применения при доставке лекарств эти магнитные наноносители должны быть биосовместимыми и нетоксичными. Размер магнитных наночастиц влияет не только на магнитные свойства, заряд и химию поверхности, но он очень сильно влияет на биодоступность частиц в организме. С одной стороны, крупные частицы диаметром более 200 нм выводятся печенью и селезенкой. Частицы размером более 5 мкм вызывают капиллярную блокаду. Частицы размером менее 10 нм будут быстро удалены путем почечного клиренса. С учетом критического размера появления у наночастиц оксидов железа суперпарамагнитных свойств их оптимальный размер (обеспечивающий длительное время циркуляции в крови и эффективность магнитного нацеливания) составляет 10–100 нм.

Методы загрузки лекарственных препаратов на магнитные частицы подразделяются на два основных типа:

- химическое связывание (соединение лекарственного вещества с носителем с помощью химических связей)
- физическое связывание (соединение лекарственного вещества с носителем с помощью физических взаимодействий).

*Химическое связывание* обычно обусловлено ковалентными связями, которые образуются за счет амино, карбоксильных и тиольных групп, находящихся на поверхности магнитной частицы и в лекарственном препарате. Как правило, эти функциональные группы добавляются к поверхности магнитных частиц через их полимерное покрытие (хитозан, полиэфиримид, декстран, полиэтиленгликоль). Эти же химические группы также могут быть использованы для закрепления пептидов, антител, вирусов для обеспечения улучшенного нацеливания. Полимерное покрытие не только позволяет закрепить лекарственный препарат или вектор на поверхности магнитной частицы, оно позволяет повысить их гидрофобность и стабильность. После магнитного наведения высвобождение лекарственного средства может быть инициировано не только внешними факторами-стимулами, такими как ограниченное повышение температуры, но и внутренними, такими, например, как изменение pH.

*Физическое связывание.* Физические взаимодействия включают электростатические, гидрофильные/гидрофобные и аффинные взаимодействия. У этого взаимодействия есть ряд преимуществ, включая быструю скорость связывания, высокую эффективность, оно не имеет промежуточных стадий модификации. Однако физические взаимодействия часто недостаточны для того, чтобы избежать высвобождения лекарственного средства во время доставки.

Магнитные поля хорошо подходят для медицинских целей, поскольку они не мешают большинству биологических процессов. Тем не менее есть несколько проблем, связанных с использованием магнитных носителей и векторов в системах направленной доставки лекарств [59]. Одной из них является влияние кровотока на целевом участке накопления систем направленной доставки. Для удержания магнитных частиц в крупных артериях потребуются более сильные магнитные поля. Линейная скорость крови в крупных артериях в 50–100 раз выше скорости кровотока в капиллярах ( $\pm 0,5$  см/с). Еще одна проблема, связанная с магнитными векторами, связана с глубиной проникновения магнитного поля в целевой объект: на цели, расположенные внутри организма на расстоянии более 2 см от кожных покровов, сложно нацеливать магнитные частицы, поскольку напряженность магнитного поля уменьшается с расстоянием. Однако работа [60] описывает разработку новой системы доставки лекарств с использованием магнитных полей, налагаемых извне (с использованием сверхпроводящих магнитов) для нацеливания магнитных частиц в кровеносных сосудах, расположенных глубоко внутри тела.

Несмотря на имеющиеся проблемы, первые системы направленной доставки лекарств с использованием магнитных частиц дошли до стадии клинических испытаний. После успешных результатов в экспериментах на животных были проведены [61] исследования на 14 пациентах с запущенными опухолями (аденокарцинома толстой кишки или гипернефрома). Внутривенное введение нагруженных эпирубицином феррожидкостей (размер частиц 100 нм) сопровождалось магнитным нацеливанием (0,8 Тл). Расстояние между поверхностью опухоли и магнитами составляло менее 0,5 см. Согласно результатам, полученным с помощью МРТ и гистологии магнитные частицы с помощью 60–120 минутного воздействия были успешно локализованы. В другом клиническом исследовании [62] 11 пациентов после неудачного традиционного лечения злокачественных опухолей лечились с помощью магнитных систем направленной доставки лекарств (0,8 Тл) и обследовались с помощью МРТ. Опухоли всех 11 пациентов различались по локации, но все они находились близко к кожным покровам. В течение периода наблюдения три пациента показали положительную динамику, пять пациентов были стабильны, и у трех пациентов болезнь прогрессировала. Очевидно, что магнитные системы направленной доставки лекарств действительно имеет большую потенциальную терапевтическую пользу, несмотря на имеющиеся проблемы и ограничения.

## Заключение

Таким образом, магнитные наночастицы становятся все более важным инструментом не только в диагностике, но и лечении заболеваний. Они активно используются для проведения широкого спектра анализов и при сепарации генов, белков, клеток. Все еще остается много проблем с поиском идеальных агентов для МРТ, повышающих чувствительность метода и одновременно обладающих низкой токсичностью. Однако проводимые в настоящее время работы с малыми (менее 5 нм) частицами магнитных оксидов железа показали их высокий потенциал в данной области. Доставка лекарств с помощью магнитных наночастиц все еще находится в стадии начальных разработок. Но уже проведенные эксперименты открывают перед современными исследователями большие возможности. Разработка методов тканевой инженерии на основе магнитных наночастиц также открывает широкие перспективы для трансплантологии и позволит решить проблему дефицита донорских органов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 16-13-10365.

## Авторы

**Верная Ольга Ивановна**, к.х.н., научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Физическая химия, химическая кинетика, катализ, фармакология, наночастицы металлов, гибридные и композитные материалы, лекарственные препараты, направленная доставка.

**Шабатин Владимир Петрович**, к.х.н., старший научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Криохимический синтез и анализ материалов со специальными свойствами, включая нанодисперсные металлы, керметы, оксиды, органические соединения, в том числе, лекарственные субстанции, фитопрепараты, витаминные препараты, криомодифицирование органических соединений.

**Шабатина Татьяна Игоревна**, д.х.н., ведущий научный сотрудник, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Криохимия, химия наноразмерных кластеров и частиц металлов, гибридные наноматериалы, металлomezогены, жидкие кристаллы, наноструктурированные пленки.

**Мельников Михаил Яковлевич**, д.х.н., профессор, заведующий кафедрой химической кинетики, МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет. Реакции электронно-возбужденных радикалов и ион-радикалов; фотохимия, радиационная химия, химическая и биологическая кинетика, реакции интермедиатов на поверхности, катализ, фотохимия координационных соединений, фармакология, физическая органическая химия.

## Литература

1. Wu K., Su D, Liu J., Saha R., Wang J.P. Magnetic nanoparticles in nanomedicine: a review of recent advances. — *Nanotechnology*, 2019, **30(50)**, 502003.
2. Akbarzadeh A., Samiei M., Davaran, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. — *Nanoscale Res. Lett.*, 2012, **7**, 144.
3. Srinivasan S.Y., Paknikar K.M., Bodas D., Gajbhiye V. Applications of cobalt ferrite nanoparticles in biomedical nanotechnology. — *Nanomedicine*, 2018, **13(10)**, 1221.
4. McBain S.C., Yiu H.H.P., Dobson J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. — *Int. J. Nanomed.*, 2008, **3**, 169.
5. Mantovan, R., Lamperti A., Georgieva M., Tallarida G., Fanciulli M. CVD synthesis of polycrystalline magnetite thin films: Structural, magnetic and magnetotransport properties. — *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2010, **43**, 065002.
6. Noqta O.A., Aziz A.A., Usman I.A., Bououdina M. Recent Advances in Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Modification for Biomedical Applications. — *J. Supercond. Nov. Magn.*, 2019, **32**, 779.
7. Singh N., Jenkins G.J.S., Asadi R., Doak S.H. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. — *Nano Reviews*, 2010, **1**, 5358
8. Karlsson H.L., Cronholm P., Gustafsson J., Möller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. — *Chem. Res. Toxicology*, 2008, **21(9)**, 1726.
9. Zhu X., Tian S., Cai Z. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. — *PLoS One.*, 2012, 7(9), e46286.
10. Bahadar H., Maqbool F., Niaz K., Abdollahi M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. — *Iran Biomed. J.*, 2016, **20(1)**, 1.
11. García A., Espinosa R., Delgado L., Casals E., González E., Puentes V., Sánchez, A. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. — *Desalination*, 2011, **269(1-3)**, 136.
12. Yarjanli Z., Ghaedi K., Esmaeili A., Rahgozar S., Zarrabi A. Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. — *BMC Neurosci*, 2017, **18**, 51.
13. Bhasin G., Kauser H., Athar M. Iron augments stage-I and stage-II tumor promotion in murine skin. — *Cancer Lett.*, 2002; **183**, 113.
14. Singh N., Manshian B., Jenkins G.J., Griffiths S.M., Williams P.M., Maffei T.G., Wright C.J., Doak S.H. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. — *Biomaterials*, 2009, **30**, 3891.
15. Vakili-Ghartavol R., Momtazi-Borojeni A. A., Vakili-Ghartavol Z., Aiyelabegan H.T., Jaafari M.R., Rezayat S.M., Bidgoli S.A. Toxicity assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in different tissues. — *Artificial Cells*, 2020, **48(1)**, 443.
16. Anzai Y., Piccoli C.W., Outwater E.K., Stanford W., Bluemke D.A., Nurenberg P., Saini S., Maravilla K.R., Feldman D.E., Schmiedl U.P., Brunberg J.A., Francis I.R., Harms S.E., Som P.M., Tempany C.M. Evaluation of neck and body metastases to nodes with ferumoxtran 10-enhanced MR imaging: phase III safety and efficacy study. — *Radiology*, 2003, **228**, 777.
17. Arruebo M., Fernández-Pacheco R., Ibarra M.R., Santamaría J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. — *Nano Today*, 2007, **2(3)**, 22.
18. Ansari S., Ficiari E., Ruffinatti F.A., Stura I., Argenziano M., Abollino O., Cavalli R.,

- Guiot C., D'Agata F. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the Central Nervous System. — *Materials* (Basel), 2019, **12**(3), 465.
19. Al-Alawy A., Al-Abodi E., Kadhim R. Synthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles by Co-Precipitation Method at Different Conditions. — *J. Eng.*, 2018, **24**(10), 60.
20. Belaïd S., Stanicki D., Elst L.V., Muller R.N., Laurent S. Influence of experimental parameters on iron oxide nanoparticle properties synthesized by thermal decomposition: size and nuclear magnetic resonance studies. — *Nanotechnology*, 2018, **29**, 165603
21. Cotin G., Kiefer C., Pertont F., Ihiwakrim D., Blanco-Andujar C., Moldovan S., Lefevre C., Ersen O., Pichon B., Mertz D., Bégin-Colin S. Unravelling the Thermal Decomposition Parameters for The Synthesis of Anisotropic Iron Oxide Nanoparticles. — *Nanomaterials* (Basel), 2018, **8**(11), 881.
22. Daou T.J., Pourroy G., Bgin-Colin S., Grenche J., Ulhaq-Bouillet C., Legar P., Bernhardt P., Leuvrey C., Rogez G., Begin-Colin S., Greneche J.M., Legaré, P. Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles. — *Chemistry of Materials*, 2006, **18**, 4399.
23. Yian H.Ch., Faizal M., Chin-Hua Ch., Shahidan R., Sarani Z., Huang M., Hn L. Hydrothermal synthesis of magnetite nanoparticles as MRI contrast agents. — *Ceramics International*, 2010, **36**. 10.1016/j.ceramint.2010.02.005.
24. Torres-Gómez N., Nava O., Argueta-Figueroa L., García-Contreras R., Baeza-Barrera A., Vilchis-Nestor A.R. Shape Tuning of Magnetite Nanoparticles Obtained by Hydrothermal Synthesis: Effect of Temperature. — *J. Nanomater.*, 2019, **2019**, 7921273.
25. Голикова Е.П. Синтез стабильных биокатализаторов на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на неорганические носители. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук. Москва. 2019. 18с.
26. Hugouenq P., Levy M., Alloyeau D., Lartigue L., Dubois E., Cabuil V., Ricolleau C., Roux S., Wilhelm C., Gazeau F., Bazzi R. Iron Oxide Monocrystalline Nanoparticles for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. — *J. Phys. Chem. C*, 2012, **116**, 15702.
27. Maity D., Chandrasekharan P., Si-Shen F., Xue J.-M., Ding J. Polyol-based synthesis of hydrophilic magnetite nanoparticles. — *Journal of Applied Physics*, 2010, **107**(9), 09B310.
28. McBain S., Yiu H., Dobson J. Magnetic Nanoparticles for Gen and Drug Delivery. — *Int. J. Nanomed.*, 2008, **3**, 169.
29. Biehl P., von der Lühe M., Dutz S., Schacher F. Synthesis, characterization, and applications of magnetic nanoparticles featuring polyzwitterionic coatings. — *Polymers*, 2018, **10**(1), 91.
30. Kurland H.-D., Grabow J., Staupendahl G., Müller F.A., Müller E., Dutz S., Bellemann M.E. Magnetite iron oxide nanopowders produced by CO<sub>2</sub> laser evaporation 'In situ' coating and particle embedding in a ceramic matrix. — *J. Magn. Magn. Mater.*, 2009, **321**, 1381.
31. Kurland H.-D., Grabow J., Dutz S., Müller E., Sierka M., Müller F.A. Control of the Crystal Phase Composition of Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub> Nanopowders Prepared by CO<sub>2</sub> Laser Vaporization. — *Cryst. Growth Des.*, 2013, **13**, 4868.
32. Timko M., Molcan M., Hashim A., Skumiel A., Müller M., Gojzewski H., Jozefczak A., Kovac J., Rajnak M., Makowski M., Kopčanský P. Hyperthermic Effect in Suspension of Magnetosomes Prepared by Various Methods. — *IEEE Trans. Magn.*, 2013, **49**, 250.
33. Koziaeva V., Grouzdev D., Dziuba M., Kolganova T., Kuznetsov B. Diversity of magnetotactic bacteria of the Moskva River. — *Microbiology*, 2017, **86**. 106.

34. Hergt R., Hiergeist R., Zeisberger M., Schuler D., Heyen U., Hilger I., Kaiser W.A. Magnetic Properties of Bacterial Magnetosomes as Potential Diagnostic and Therapeutic Tools. — *J. Magn. Magn. Mater.*, 2005, **293**, 80.
35. Safarik I, Safarikova M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. — *Biomagn. Res Technol.*, 2004, **2(1)**, 7.
36. Hira F., Kyo-Seon K. Magnetic nanoparticles for bioseparation. — *Korean J. Chem. Eng.*, 2017, 34.
37. Wu A., Ou P., Zeng L. Biomedical applications of magnetic nanoparticles. *Nano*, 2010, **05(05)**, 245.
38. Olsvik O., Popovic T., Skjerve E., Cudjoe K., Hornes E., Ugelstad J., Uhlen M. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. — *Clinical microbiology reviews.*, 1994, **7**, 43.
39. Cai G., Wang S., Zheng L., Lin J. A fluidic device for immunomagnetic separation of foodborne bacteria using self-assembled magnetic nanoparticle chains. — *Micromachines (Basel)*, 2018, **9(12)**, 624.
40. Thanyasrisung P., Vittayaprasit A., Matangkasombut O., Sugai M., Na Nongkai P., Saipia S., Hoven V.P. Separation and detection of mutans streptococci by using magnetic nanoparticles stabilized with a cell wall binding domain-conjugated polymer. — *Analytical Methods*, 2018, **10(27)**, 3332.
41. in J., Li M., Li Y., Chen Q. A high gradient and strength bioseparator with nano-sized immunomagnetic particles for specific separation and efficient concentration of *E. coli O157:H7*. — *J. Magnetism Magnetic Mater.*, 2015, **378**, 206.
42. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. — *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **73(3)**, 495.
43. Bao Y., Sherwood J.A., Sun Z. Magnetic iron oxide nanoparticles as  $T_1$  contrast agents for magnetic resonance imaging. — *J. Mater. Chem. C*, 2018, **6(6)**, 1280.
44. Shen Z., Wu A., Chen X. Iron Oxide Nanoparticle Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. — *Molec. Pharm.*, 2016, **14(5)**, 1352.
45. Yaneva M., Ivanov Y., Todorov N., Godjevargova T. Magnetic-nanoparticles-based fluorescent immunoassay for individual and simultaneous determination of dichlorvos and paraoxon in milk. — *Food and Agricultural Immunology*, 2018, **29(1)**, 228.
46. Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Application of Magnetic Nanoparticles in Immunoassay. — *Nanotechnol Russia*, 2017, **12**, 471.
47. Ito A., Kamihira M. Tissue Engineering Using Magnetite Nanoparticles. — *Nanoparticles in Translational Science and Medicine*, 2011, 355.
48. Cartmell S.H., Dobson J. The Use of Magnetic Particles in Tissue Engineering. — *Nanotechnologies for the Life Sciences*, online, 2011, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527610419.ntls0170>
49. Alsberg E., Feinstein E., Joy M.P., Prentiss M., Ingber D.E. Magnetically — guided self — assembly of fibrin matrices with ordered nano — scale structure for tissue engineering. — *Tissue Engineering*, 2006, **12**, 3247.
50. Wilhelm C., Bal L., Smirnov P., Galy — Fauroux I., Clement O., Gazeau F., Emmerich J. Magnetic control of vascular network formation with magnetically labeled endothelial progenitor cells. — *Biomaterials*, 2007, **28**, 3797.

51. Ruta S., Chantrell R., Hovorka O. Unified model of hyperthermia via hysteresis heating in systems of interacting magnetic nanoparticles. — *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 9090.
52. Chang D., Lim M., Goos J.A.C.M., Qiao R., Ng Y.Y., Mansfeld F. Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations *Frontiers in Pharmacology*. — *Frontiers in Pharmacology*, 2018, **9**, 000831.
53. Iyer A.K., Khaled G., Fang J., Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. — *Drug Discov. Today*, 2006, 812.
54. DeNardo S.J., Denardo G.L., Natarajan A., Miers L.A., Foreman A.R., Gruettner C., Adamson G.N., Ivkov R. Thermal dosimetry predictive of efficacy of <sup>111</sup>In-ChL6 nanoparticle AMF-induced thermoablative therapy for human breast cancer in mice. — *J. Nucl. Med.*, 2007, **48**, 437.
55. Постнов В.Н., Наумышева Е.Б., Королев Д.В., Галагудза М.М. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов. — *Биотехносфера*, 2013, **6(30)**, 16.
56. Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Оборин В.А., Девришов Д.А., Копылов С.Н. Направленный транспорт лекарственных препаратов: современное состояние вопроса и перспективы. — *Известия Коми научного центра УрО РАН*. 2012, **1(9)**, 46.
57. Arguebo M., Pacheco R., Ibarra M., Santamaría J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. — *Nano Today*, 2007, **2**, 22.
58. Bharti C., N.Dr. Upendra, Pal A., Gulati N. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. — *Int. J Pharm. Investigation*. 2015, **5**, 124.
59. Bárcena C., Sra A.K., Gao J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. — *Nanoscale Magnetic Mater. Appl.*, 2009, 591.
60. Development of magnetically targeted drug delivery system using superconducting magnet. — *J. Magn. Magn. Mater.*, 2007, **311**, 367.
61. Lübbe A.S., Alexiou C., Bergemann C. Clinical applications of magnetic drug targeting. — *J. Surg. Res.*, 2001, **95**, 200.
62. Lemke A.-J., Senfft von Pilsach M.I., Lübbe A., Bergemann C., Riess H., Felix R. MRI after magnetic drug targeting in patients with advanced solidmalignant tumors. — *Eur. Radiol.* 2004, **14**, 1949.

Производство книг на заказ  
Издательство «ТЕХНОСФЕРА»  
тел.: (495) 234-01-10  
e-mail: [knigi@technosphaera.ru](mailto:knigi@technosphaera.ru)

**Реклама в книгах:**

- модульная
- статьи

**Подробная информация о книгах на сайте**  
<http://www.technosphaera.ru>

## **Гибридные наноформы биоактивных и лекарственных веществ**

**Под редакцией М.Я. Мельникова, Л.И. Трахтенберга**

Компьютерная верстка – ИП Автушенко Р.В.  
Дизайн – Н.И. Семячкина  
Выпускающий редактор – О.Н. Кулешова  
Ответственный за выпуск – С.А. Орлов

---

Подписано в печать 30.04.2020  
Формат 70×100/16. Печать офсетная.  
Гарнитура Computer modern LaTeX  
Печ.л. 25,5. Тираж 200 экз. Зак. № Т-596  
Бумага офсет. №1, плотность 80 г/м<sup>2</sup>.

---

Издательство «ТЕХНОСФЕРА»  
Москва, ул. Краснопролетарская, д.16, стр.2

---

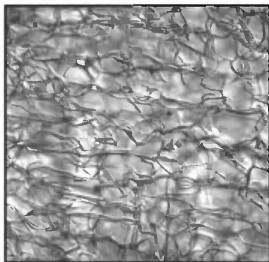
Отпечатано в полном соответствии с качеством  
предоставленного электронного оригинал-макета  
в типографии АО «Т 8 Издательские Технологии»  
109316, г. Москва, Волгоградский проспект, д.42



# М материалов и технологий

Гибридные  
наноформы  
биоактивных  
и лекарственных  
веществ

ПОД РЕДАКЦИЕЙ М.Я. МЕЛЬНИКОВА,  
Л.И. ТРАХТЕНБЕРГА



ТЕХНОСФЕРА

# мир материалов и технологий

Гибридные наноформы  
биоактивных и лекарственных  
веществ

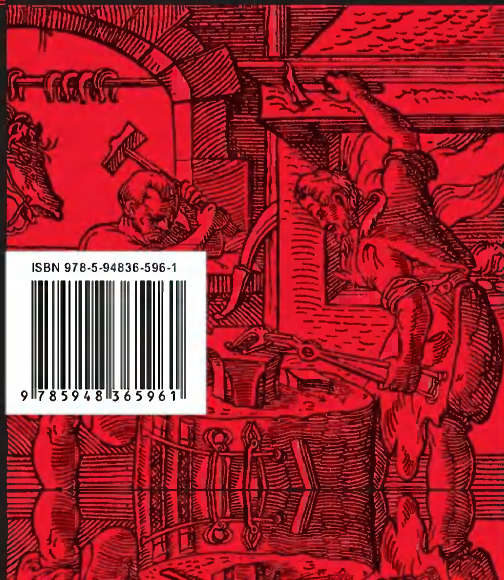
Под редакцией М.Я. Мельникова,  
Л.И. Трахтенберга



**МЕЛЬНИКОВ МИХАИЛ ЯКОВЛЕВИЧ** –  
Д.Х.Н., ПРОФЕССОР, ЗАВЕДУЮЩИЙ  
КАФЕДРОЙ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ, МГУ  
ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА, ХИМИЧЕСКИЙ  
ФАКУЛЬТЕТ

**ТРАХТЕНБЕРГ ЛЕОНИД ИЗРАЙЛЕВИЧ** –  
Д.Ф. –М.Н., ПРОФЕССОР, ЗАВЕДУЮЩИЙ  
ЛАБОРАТОРИЕЙ ИХФ РАН

В УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ ВКЛЮЧЕНЫ  
РАЗДЕЛЫ, ОХВАТЫВАЮЩИЕ РАЗЛИЧНЫЕ  
АСПЕКТЫ СИНТЕЗА И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ  
НАНОФОРМ БИОАКТИВНЫХ  
И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ



ISBN 978-5-94836-596-1



ТЕХНОСФЕРА