

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КРИСТАЛЛОГРАФИЯ И ФОТОНИКА»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ КРИСТАЛЛОГРАФИИ им. А.В. ШУБНИКОВА РАН

На правах рукописи

АРХАРОВА НАТАЛЬЯ АНДРЕЕВНА

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

Специальность 01.04.18 – кристаллография, физика кристаллов

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук, профессор
Клечковская Вера Всеволодовна

Москва 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Методы исследования структуры полимерных систем.....	12
1.1.1. Дифракционные методы.....	12
1.1.2. Высокоразрешающая просвечивающая электронная микроскопия.....	14
1.1.3. Сканирующая электронная микроскопия.....	15
1.1.4. Методы выявления текстуры.....	16
1.1.5. Методы компьютерного моделирования.....	17
1.2. Структура нано-гель-пленки бактериальной целлюлозы (БЦ).....	18
1.2.1. Механизм биосинтеза нано-гель-пленки БЦ.....	19
1.2.2. Морфология и свойства нано-гель-пленки БЦ.....	20
1.2.3. Микрористаллическая структура нано-гель-пленки БЦ.....	22
1.3. Композиты на основе бактериальной целлюлозы.....	26
1.3.1. Взаимодействие наночастиц, стабилизированных полимером, с матрицей БЦ.....	27
1.3.2. Композиты с нанокристаллами гидроксиапатита (ГАП): получение, структура и свойства.....	30
1.3.2.1. Структура и свойства естественной костной ткани.....	30
1.3.2.2. Гидроксиапатит: структура и свойства.....	36
1.3.2.3. Композиты на основе БЦ и нанокристаллов ГАП.....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
2.1. Материалы и приготовление образцов для исследований.....	43
2.1.1. Целлюлоза <i>Glucanacetobacter xylinus</i> (ЦГХ).....	43
2.1.2. Наночастицы селена и композиты нано-гель-пленка ЦГХ/ нано- селен.....	44
2.1.3. Нанокристаллы ГАП и композиты на основе ЦГХ и ГАП.....	45

2.2. Методы структурной диагностики.....	47
2.2.1. Рентгеновская и электронная дифракция.....	48
2.2.2. Методы электронной микроскопии.....	50
2.3. Исследование физико-химических свойств композитов ЦГХ/ ГАП.....	58
ГЛАВА 3. МАТРИЦА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ GLUCONACETOBACTER XYLINUS: ТЕКСТУРА И ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ.....	60
3.1. Оптимизация метода низковольтной сканирующей электронной микроскопии в исследовании ЦГХ.....	60
3.2. Морфология ЦГХ. Определение размеров пор на поверхности высушенных пленок.....	69
3.3. Особенности текстуры исходной и дезинтегрированной пленок ЦГХ....	74
ГЛАВА 4. СТРУКТУРА КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ НАНО-ГЕЛЬ- ПЛЕНКИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ GLUCONACETOBACTER XYLINUS И НАНОКОМПЛЕКСОВ СЕЛЕНА.....	77
4.1. Структура наночастиц селена в коллоидном растворе.....	77
4.2. Структура композитов на основе нано-гель-пленки ЦГХ/нано-селен.....	78
4.3. Структура композитов на основе нано-гель-пленки ЦГХ и наночастиц из растворов, содержащих одновременно ионы селена и серебра.....	83
ГЛАВА 5. МОРФОЛОГИЯ, СТРУКТУРА И СВОЙСТВА КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ GLUCONACETOBACTER XYLINUS И НАНОКРИСТАЛЛОВ ГИДРОКСИАПАТИТА.....	92
5.1. Структура нанокристаллов ГАП.....	92
5.2. Структурные особенности композитных пленок на основе дезинтегрированной нано-гель-пленки ЦГХ и нанокристаллов ГАП.....	93
5.2.1. Композиты, полученные механическим смешиванием водных суспензий ЦГХ и ГАП.....	93
5.2.2. Композиты, полученные при проведении синтеза нанокристаллов ГАП в присутствии фрагментов ЦГХ.....	97

5.2.3. Композиты, полученные при проведении синтеза ЦГХ в присутствии ГАП.....	105
5.3. Свойства композитов на основе ЦГХ и нанокристаллов ГАП, полученных разными методами.....	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	118
ВЫВОДЫ.....	120
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123

ВВЕДЕНИЕ

Анализ научной и патентной литературы показывает, что в последние годы во многих лабораториях развитых стран отмечается значительное повышение интереса к полисахаридам, в частности к целлюлозе как основному возобновляемому биополимеру на Земле. Это подтверждается изданием в Лондоне с 1994 года специального международного журнала *Cellulose*. Широко известные нарушения экологии в биосфере и постоянно возрастающая потребность многочисленных применений целлюлозы делают ее дефицитным продуктом и требуют поиска альтернативных источников ее получения по сравнению с общепринятыми. На данном этапе предпочтение в большей степени отдается изучению бактериальной целлюлозы, продуцируемой бактериями на наноуровне (в отличие от растительной целлюлозы самосборка макромолекул заканчивается на дискретном наноуровне (квантовая проволока)). Наноуровневая дискретность приводит при статическом культивировании к образованию механически прочной нано-гель-пленки с удельной внутренней поверхностью не менее $500 \text{ м}^2/\text{г}$ и к недостижимому для растительной целлюлозы удержанию воды (соотношение полимер/вода $\sim 1/100$). В последнее время интенсифицировались исследования ее тонких структурных особенностей с использованием биохимических, генетических, физико-химических и теоретических методов.

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

Отечественная целлюлоза *Gluconacetobacter xylinus* (ЦГХ) синтезируется в Санкт-Петербургском государственном университете (штамм N 169 GALU), где

отработана технология ее получения при статическом культивировании [3], не требующая больших капиталовложений благодаря дешевым компонентам питательной среды, что позволяет рассматривать ЦГХ как экономически эффективный материал.

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

Кроме того, в качестве прекурсора костной ткани перспективным считается композит на основе ЦГХ и нанокристаллов гидроксиапатита (ГАП), обладающий биосовместимостью с живыми организмами [9-11]. Возможность направленного синтеза ЦГХ и включения в нее разнообразных добавок позволяют рассматривать такие материалы в качестве универсального биоматериала для костной и тканевой инженерии в целом. На основе ЦГХ уже получен искусственный хрящ, превосходящий по свойствам аналоги, и апробирован прекурсор костной ткани, показывающий хорошую совместимость в опытах на животных [12].

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

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

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

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

Научная новизна работы

- Впервые установлены различия в морфологии и структуре исходной нано-гель-пленки ЦГХ и пленок, полученных высушиванием суспензий дезинтегрированной нано-гель-пленки ЦГХ.
- Обнаружено, что введение в нано-гель-пленку ЦГХ наночастиц из растворов, содержащих одновременно ионы Se и Ag приводит к образованию в композите нанокристаллов Se, Ag₂Se и нанопроволок Se на его поверхности.
- Предложен новый метод получения композита ЦГХ/ГАП: образование нанокристаллов ГАП в присутствии в растворе фрагментов нано-гель-

пленки целлюлозы. Показано, что изменение массовой доли целлюлозы в растворе позволяет управлять размерами нанокристаллов ГАП.

- Получен композитный материал на основе дезинтегрированной целлюлозы и нанокристаллов гидроксиапатита с управляемым градиентом физико-химических характеристик.

Практическая значимость работы

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

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

Основные результаты и научные положения, выносимые на защиту:

- При статическом культивировании нано-гель-пленки ЦГХ морфология ее поверхностей, обращенных наружу и в питательный раствор, различна. В связи с этим адсорбция и проникновение наночастиц в архитектуру нано-гель-пленки через разные поверхности существенно отличаются.

- Введение в нано-гель-пленку ЦГХ наночастиц из растворов, содержащих одновременно ионы Se и Ag приводит к образованию в композите нанокристаллов тригонального Se, ромбического Ag_2Se и нанопроволок тригонального Se на его поверхности.
- При получении композитов ЦГХ/ГАП, полученных тремя различными способами, нанокристаллы ГАП ориентируются направлением $[0001]$ вдоль поверхности фибрилл ЦГХ.
- В композитных пленках, полученных на основе суспензии ЦГХ, установлена корреляционная зависимость плотности, модуля упругости, пористости и площади удельной поверхности от массовой доли ЦГХ, что открывает возможность управления физико-химическими свойствами материалов ЦГХ/ГАП.

Личный вклад диссертанта

Автор принимала участие в получении композитных материалов на основе ЦГХ/нано-Se, ЦГХ/нано-ГАП и самостоятельно готовила образцы для структурных исследований. Все микрофотографии композитов, а также ВРЭМ изображения отдельных наночастиц были получены автором лично на микроскопах FEI Tecnai G² 30ST и FEI Tecnai Osiris (ИК РАН, г. Москва), FEI Titan 80-300 с probe-корректором (НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва). Автор самостоятельно отработывала методику съемки поверхностей нано-гель-пленок ЦГХ на сканирующих электронных микроскопах FEI Quanta 200 3D и FEI Scios (ИК РАН, г. Москва), анализируя полученные результаты, сравнивая их с теоретическими расчетами и оптимизируя метод низковольтной СЭМ для исследования морфологии ЦГХ, а также композитов на ее основе. Полученные электронно-микроскопические результаты были обработаны автором, с помощью пакета программ Digital Micrograph Software 1.84 (Gatan Inc., Pleasanton), JEMS (Stadelmann, 2015), TIA ES Vision 4.8 (FEI).

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

Апробация результатов работы

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

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

Работа была поддержана грантами РФФИ №14-02-31258_мол_а, РФФИ №16-32-50065_мол_нр.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих статьях:

1. Arkharova N., Suvorova E., Severin A., Krashennnikov S., Khripunov A., Klechkovskaya V. SEM and TEM for structure and properties characterization of bacterial cellulose/hydroxyapatite composites// Scanning. -2016. - V.38. - P.757-565.

2. Романов Д.П., Хрипунов А.К., Баклагина Ю.Г., Северин А.В., Лукашева Н.В., Толмачев Д.А., Лаврентьев В.К., Ткаченко А.А., Архарова Н.А., Ключковская В.В., Нанотекстуры композитов, образующихся при взаимодействии гидроксиапатита и целлюлозы *Glucosacetobacter xylinus*// Физика и химия стекла. – 2014. – Т. 40. - С.485-495.

3. Баклагина Ю.Г., Лукашева Н.В., Хрипунов А.К., Ключковская В.В., Архарова Н.А., Романов Д.П., Толмачев Д.А. Взаимодействие между наноразмерными кристаллическими компонентами композита на основе целлюлозы *Acetobacter Xylinum* и фосфатов кальция// Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2010. - Т. 52.- С.615-627.

4. Волков В.В., Ключковская В.В., Штыкова Э.В., Дэмбо К.А., Архарова Н.А., Ивакин Г.И., Смыслов Р.Ю. Определение размера и фазового состава наночастиц серебра в гель-пленке бактериальной целлюлозы методами малоуглового рентгеновского рассеяния, электронной дифракции и электронной микроскопии// Кристаллография. – 2009. - Т.54. – С. 197-201.

5. Klechkovskaya V.V., Volkov V.V., Shtykova E.V., Arkharova N.A., Baklagina Y.G., Khripunov A.K., Smyslov R.Yu., Borovikova L.N., Tkachenko A.A., Network model of *Acetobacter xylinum* Cellulose intercalated by drug nanoparticles// NATO security through Science Series C: Environmental Security. -2008. - С. 165-177.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения и списка литературы из 187 наименований. Общий объем диссертации – 142 страницы, включая 61 рисунок и 5 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Методы исследования структуры полимерных систем

Полимерные материалы представляют собой совокупность макромолекулярных цепей, состоящих из мономеров длиной $\sim 0.1 - 10$ нм. В зависимости от упорядоченности они могут иметь разную степень кристалличности [13, 14, 15]. Подвижные молекулярные звенья образуют надмолекулярные структуры разного типа. В одних случаях звенья располагаются упорядоченно, при этом появляется трехмерная периодическая решетка и возникает кристаллическая структура, в других случаях звенья располагаются хаотично, дальний порядок в таком материале отсутствует, то есть он является аморфным. Надмолекулярная структура полимеров определяет их свойства, например: плотность и механическая прочность возрастают с увеличением степени кристалличности [16].

Одной из актуальной задач в исследовании полимеров является определение степени кристалличности полимеров, проведение фазового и структурного анализа, выявление наличия текстуры, описание структур с различными конформациями молекул, а также исследование морфологических особенностей полимеров и композитов на их основе.

1.1.1. Дифракционные методы

Исторически традиционными методами исследования структуры материалов являются рентгенография, электронография и нейтронография. Несмотря на различную природу упомянутых излучений, основные положения структурного анализа едины для всех методов и сводятся к установлению координат атомов в кристалле. Основоположником структурного анализа цепных молекул в разных полимерных системах является Б. К. Вайнштейн [17,18]. В

работах по изучению взаимодействия рентгеновских лучей и электронов с различными молекулярными системами он не раз указывал на важность сопоставления результатов, полученных разными методами, что, безусловно, повышает точность, а также дает возможность получения наиболее полной информации о структуре исследуемых материалов.

Степень кристалличности большого объема полимеров может быть легко оценена методом рентгеновской дифрактометрии. В зависимости от ширины дифракционных пиков полимеры можно разделить на высококристаллические, например полиэтилен, нейлон и др.; паракристаллические (с различными нарушениями дальнего порядка), частично кристаллические, частично аморфные - полиэтилен, полилактид и др., микрокристаллические – целлюлоза и др., аморфные – поликарбонат, полиметилметакрилат и др [19]. Важной особенностью метода рентгеновской дифрактометрии является возможность исследования структуры полимеров от влажного до сухого состояния. Сообщается о структурных изменениях в целлюлозе, полипропилене и полиэстере при постепенном удалении водной составляющей из объема [20, 21].

Однако при исследовании полимерных объектов на дифрактограммах наблюдается уширение дифракционных максимумов в том случае, когда кристаллиты имеют размер менее 100 нм. Кроме того, возможно перекрытие дифракционных рефлексов в случае многокомпонентных полимерных систем, что делает практически невозможным проведение полного фазового анализа.

Метод электронный дифракции, позволяющий проводить локальный структурный анализ областей размером 200- 100 мкм (электронография) до единиц нанометров (просвечивающая электронная микроскопия (дифракция в сходящемся пучке)) является незаменимым для полимерных систем. При этом наличие преимущественно легких атомов в полимерных системах сводит к минимуму эффекты динамического рассеяния, что значительно упрощает проведение структурного анализа. Сильное взаимодействие электронов с полимерными материалами, с одной стороны, позволяет получать информацию о расположении легких атомов, что затруднительно сделать в рентгеновской

дифрактометрии, с другой - может вызывать радиационные повреждения чувствительных полимерных материалов, что приводит к необходимости использования охлаждения образцов или использования электронов низкой энергии.

1.1.2. Высокоразрешающая просвечивающая электронная микроскопия (ВРЭМ)

С развитием электронной микроскопии появилась возможность изучать морфологию и структуру образцов, а также получать информацию об их химическом составе.

Из-за большой чувствительности полимерных систем к воздействию электронного пучка проведение фазового анализа в нанометровой области сводится не к применению метода дифракции в сходящемся пучке (нано-дифракции), при котором происходит сильное взаимодействие электронов с материалом, а к получению дифрактограмм (преобразований Фурье) от ВРЭМ-изображений. Локальный нагрев, образование заряда на поверхности приводит к дрейфу образца под воздействием пучка электронов, что существенно искажает изображение. Здесь на помощь приходят программы для обработки ВРЭМ-изображений, одной из которых является программа JEMS [22], используемая в данной работе.

Именно с помощью ВРЭМ-изображений в полимерных системах удалось обнаружить классические дефекты упаковки в кристаллических структурах полимеров, такие как дислокации, границы зерен и др.[23].

Существенно снизить порог чувствительности полимерных систем возможно с помощью использования низковольтной электронной микроскопии. Уменьшение ускоряющего напряжения в микроскопе увеличивает контраст, но приводит к понижению разрешения на ВРЭМ-изображении. Однако благодаря усовершенствованию коррекционных систем линз удается получать ВРЭМ-изображения при напряжениях < 80 кВ [24].

Увеличить стабильность полимерных материалов под электронным пучком высоких энергий (300 – 400 кВ) в современной криогенной просвечивающей электронной микроскопии возможно путем охлаждения образцов до температуры жидкого азота [25]. Это позволяет получать ВРЭМ-изображения без повреждения кристаллической структуры полимера.

1.1.3. Сканирующая электронная микроскопия

Сложность в исследовании полимеров в сканирующем электронном микроскопе, как материалов диэлектрической природы, состоит в накапливании заряда на поверхности, что приводит к невозможности получить достоверную информацию об их морфологии и структуре.

В настоящее время существует несколько подходов к решению данной проблемы. Известно, что при определенном значении энергии первичных электронов (< 2 кэВ) может возникнуть ситуация, при которой суммарный ток вышедших электронов будет равен току первичного пучка, и на поверхности образуется нулевой заряд. Это дает возможность получить информацию о поверхности образца без напыления проводящих покрытий. Подробно об экспериментальном и теоретическом нахождении значения такой энергии описано в работах [26, 27].

Морфология и структура высушенных полимерных материалов может существенно отличаться от их структуры во влажном состоянии. Исследование полимеров во влажном состоянии, а также в процессе высыхания в сканирующем электронном микроскопе осуществляется с помощью метода естественной среды [28, 29].

Сканирующие электронные микроскопы последнего поколения (Helios (FEI), Scios (FEI), JSM (JEOL), Merlin (Zeiss)) снабжены разнообразными детекторами (вторичных, обратно рассеянных электронов и т.д.), позволяющих получать наиболее полную информацию о морфологии и составе материалов. Использование внутрилинзовых (inlens) детекторов вторичных и обратно

рассеянных электронов в режиме включенной магнитной линзы улучшает коллекционную способность микроскопа и повышает уровень сигнал/шум. А применение режима «тормозящего излучения» позволяет использовать детекторы обратно-рассеянных электронов при низких энергиях (<2 эВ) падающего излучения на образец, что существенно увеличивает контраст изображений, который особенно важен для полимерных систем [30, 31].

1.1.4. Методы выявления текстуры

Одной из важнейших проблем в области определения строения высокополимерных веществ считается разработка способов максимально полной характеристики степени упорядоченности молекул. Наиболее полную информацию можно получить от высокоупорядоченных монокристаллических полимерных материалов. Если же образец состоит из множества мелких кристаллитов, то при их хаотическом расположении имеем дело с поликристаллом, но если в нем есть преимущественное кристаллографическое направление или плоскость, вдоль которых располагаются кристаллиты, то образец обладает текстурой (т.е. преимущественной ориентацией кристаллитов) [13, 17].

При анализе ориентированных полимеров большой информативностью обладает как рентгеноструктурный текстурный анализ, так и метод электронной дифракции. Текстуры, характеризуемые распределением по углам нормалей к кристаллографическим плоскостям, могут быть трех типов: аксиальная, плоская и полная [14]. Из текстур-рентгенограммы и текстур-электронограмм могут быть получены данные о размерах кристаллитов, а также о степени кристалличности. Размер и форма кристаллитов могут быть определены также с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния [13, 14].

Текстура или преимущественная ориентация длинноцепочечных молекул может формироваться в полимерах в процессе кристаллизации, под воздействием температуры или в результате пластической деформации [32,33]. Известно, что

некоторые полимеры, например целлюлозы различных природных источников, могут обладать текстурой без приложения внешних воздействий [14, 20,34].

1.1.5. Методы компьютерного моделирования

Кристаллическая структура полимеров довольно несовершенна, что отражается на характере экспериментальных данных, получаемых дифракционными методами. Это приводит к сложности проведения полного трехмерного структурного анализа. Поэтому методы компьютерного моделирования, позволяющие учитывать разные конформации молекул и молекулярные упаковки полимерных цепей, играют важную роль в описании кристаллической структуры.

Метод Монте-Карло используется при изучении поведения как отдельных полимерных молекул, так и всей полимерной среды, находящейся в аморфном, кристаллическом или жидкокристаллическом состоянии. Он широко используется при изучении фазового разделения в полимерных системах [35, 36].

При изучении последовательности формирования фаз мощным инструментом является метод молекулярной динамики. Моделирование основано на численном решении классических уравнений движения для системы взаимодействующих материальных частиц (атомов).

Актуальными становятся методы полноатомного компьютерного моделирования, учитывающие специфику взаимодействия органической и минеральной фаз при создании композитов на основе полимеров [37]. Они дают информацию о процессах, происходящих при синтезе композиционного материала на атомарном уровне, о структурных и конформационных изменениях в межфазных областях. При изучении композитных материалов, основанных на полимерных системах, важно правильно подобрать потенциалы взаимодействия молекул для моделирования структуры в межфазной области, которые должны корректно описывать кристаллическую структуру компонентов. Потенциалы взаимодействий для минералов, как правило, представлены в виде

дальнодействующих электростатических взаимодействий. В случае органических соединений атомы несут на себе зачастую слабые парциальные заряды и роль электростатических взаимодействий для них меньше. Поэтому при моделировании систем, включающих в себя органические и минеральные соединения, возникает проблема правильного описания взаимодействий между ними. Для решения этой проблемы используются специальные подходы и, в частности, метод “сшивания” двух силовых полей [38].

Среди коммерческих программных комплексов, позволяющих проводить молекулярное моделирование, следует отметить программы HyperChem (Hypercube), GROMACS, VMD (Visual Molecular Dynamics), Alchemy 2000. Среди российских разработок следует назвать MoDyp© (МГУ им. Ломоносова).

Комплекс вышеизложенных методов позволяет исследовать структуру полимерных материалов от макромасштаба до атомного уровня, что, безусловно, важно для понимания внутренней природы как самого полимера, так и композитов на его основе, и может пролить свет на взаимосвязь между структурой и свойствами полученного материала.

1.2. Структура нано-гель-пленки бактериальной целлюлозы (БЦ)

Бактериальная целлюлоза (БЦ), образуемая при статическом культивировании, представляет собой нано-гель-пленку со сложной архитектурой, состоящей из сетки кристаллических микрофибрилл и лент, и содержащую в своем объеме до 98% воды. Уникальная структура и свойства (эластичность, пористость, прочность) бактериальной целлюлозы определяют интерес исследователей к этому материалу. При этом важно построить иерархию структур от мономерных молекул до микроуровня, а также уточнить ее сложное строение в макромасштабе.

Стремительное развитие современных научно-исследовательских технологий и проведение высокого уровня структурных исследований (электронно-микроскопические, электроно-, рентгено- и нейтронографические

методы) дает возможность существенно приблизиться к определению структурных особенностей как самой целлюлозы, так и композитов на ее основе, найти взаимосвязь между структурой и свойствами материала

1.2.1. Механизм биосинтеза нано-гель-пленки БЦ

Первое сообщение о том, что бактерия *Gluconacetobacter* (*Acetobacter*) *xylinum* синтезирует гелеобразную массу появилось еще в 1886 (J. Brown). Однако интерес к бактериальной целлюлозе в полной мере проявился только во второй половине 20 века. Изучение синтеза бактериальной целлюлозы (за модель была взята бактерия *Acet/ Xylinum*) начали Hestrin et al. в 1947 году [39], которые показали, что клетки *Acetobacter* синтезируют целлюлозу в присутствии глюкозы и кислорода.

Механизм образования бактериальной целлюлозы на поверхности питательной среды был впервые предложен Брауном в 1996 году [40]. В процессе биосинтеза различные углеродные соединения питательной среды утилизируются бактерией, затем полимеризуются в простую линейную β -1,4 глюкозную цепь и, наконец, выделяются на поверхности клетки через линейный ряд пор, расположенных на ее внешней мембране (терминальный комплекс). Последующая сборка β -1,4-глюкозных цепей снаружи ячейки является точным иерархическим процессом. Вначале формируются миникристаллические субфибриллы из 10-15 цепей, затем микрофибриллы и, наконец, пакеты микрофибрилл, состоящие из свободно извитых лент (Рис.1.1).

Студенистая мембрана (гель-плёнка) бактериальной целлюлозы, сформированная в культурально- статических условиях, характеризуется 3-D структурой, состоящей из ультратонкой сетки одноосно ориентированных целлюлозных кристаллических микрофибрилл. Микрофибриллы целлюлозы имеют наноразмерный размер, в частности их толщина 2-7 нм, и объединяются в лентовидные волокна (диаметр волокна порядка 100 нм, а длина до 100 мкм),

образующие пористую губку, которая способна впитывать водный раствор в количестве, на два порядка превышающем собственный вес.

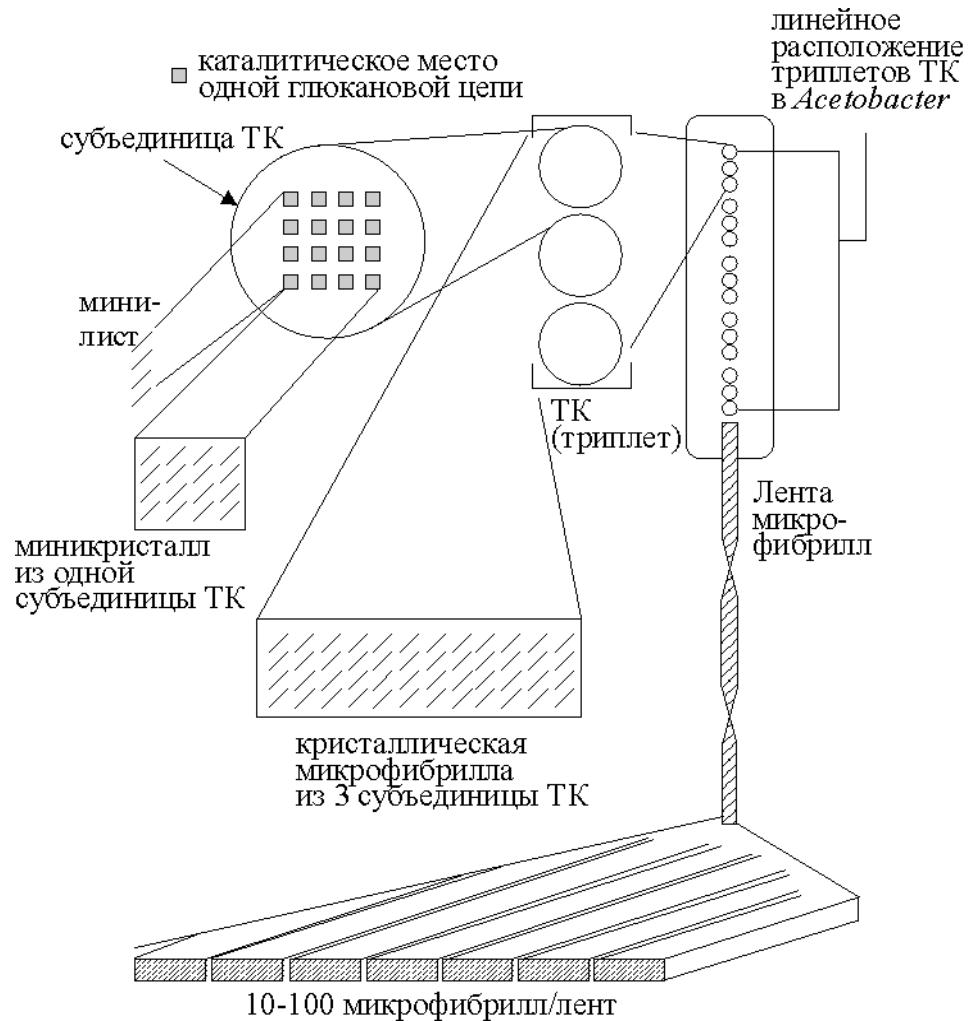


Рис.1.1.Механизм образования бактериальной целлюлозы *Acetobacter xylinum* по Брауну [40].

Синтезированная гель-пленка бактериальной целлюлозы, а также СЭМ-изображения верхней и боковой поверхностей представлены на Рис.1.2 [41].

1.2.2. Морфология и свойства нано-гель-пленки БЦ

Главным достоинством БЦ является ее высокопористая структура в сочетании с исключительно высокой механической прочностью. Предел прочности на разрыв листов гель-пленки БЦ составляет порядка 241.42 ± 21.86 МПа, МА, а модуль Юнга 6.86 ± 0.32 ГПа. Причем модуль Юнга отдельного

целлюлозного волокна, имеющего диаметр от 35 до 90 нм, составляет 78 ± 17 ГПа.[42]. В своей работе Grande et al. [43] определили морфологические свойства гель-пленки БЦ: средний размер «сетки» БЦ (расстояние между узловыми точками) – 0.523 ± 0.273 мкм, ориентация волокон (усредненный угол, образованный сегментами и осью x) – $85.64 \pm 0,56^\circ$. Несмотря на то что гель-пленка БЦ является нанопористой структурой, определение размера нанопор на ее поверхностях прямыми методами является нетривиальной задачей: как и большинство полимерных систем целлюлоза GX обладает диэлектрическими свойствами, что приводит к медленному стеканию заряда с поверхности при локальном облучении электронным пучком, а также к радиационным повреждениям. Это требует усовершенствования методов приготовления материала, а также оптимизации методов исследования. По данным, полученным с помощью ядерно-магнитного резонанса и малоуглового рентгеновского рассеяния, размер пор в гель- пленке целлюлозы варьируется от 1-2 до 50 нм [44].

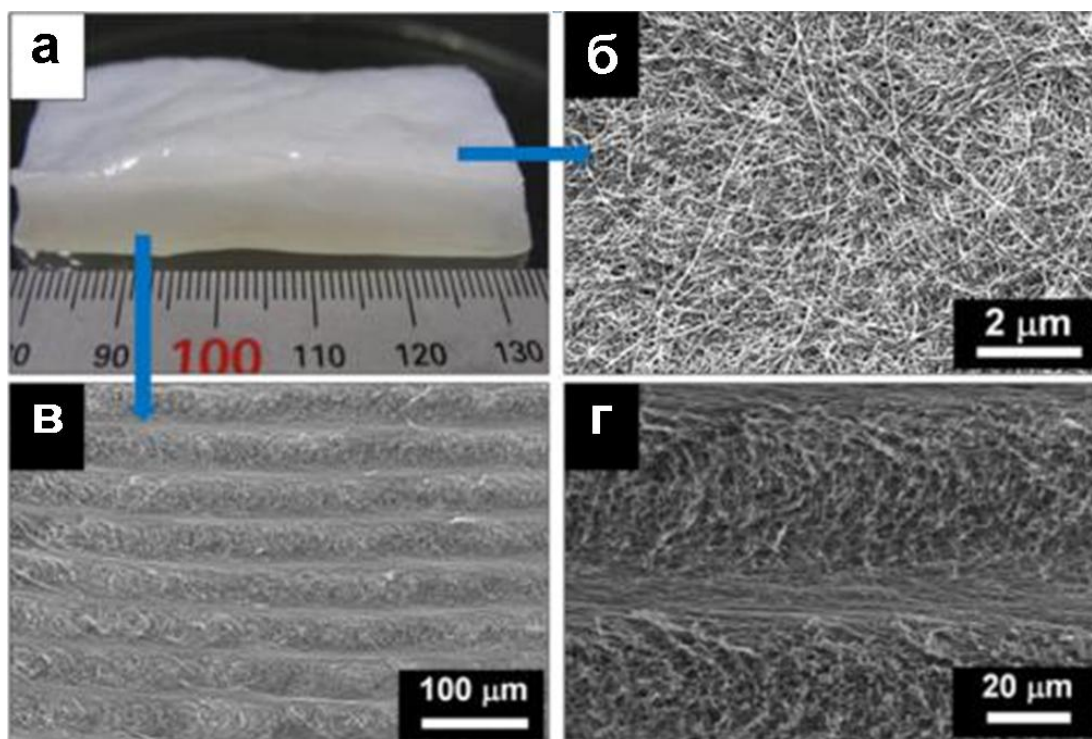


Рис.1.2. Фотография гель- пленки бактериальной целлюлозы (а), СЭМ-изображения ее верхней поверхности (б) и боковой поверхности при разных увеличениях (в, г) [41].

1.2.3. Микрористаллическая структура нано-гель-пленки БЦ

Исследования структуры бактериальной целлюлозы *Acetobacter xylinum* выявило существование двух кристаллических полиморфных форм I_α и I_β [45, 46]. Причем соотношение I_α/I_β может изменяться при выборе различных штаммов и условий культивирования [47]. Установлено, что введение в питательную среду карбоксиметилцеллюлозы или ксилоглюкана снижает образование кристаллической фазы I_α , увеличивая фракцию I_β , что связано, по данным электронной микроскопии, с уменьшением ширины микрофибрилл ЦГХ [48, 49]. Подобные эффекты наблюдались и другими авторами [50] при внесении в питательную среду ряда олиго- и полисахаридов. Структура целлюлозы I_β описывается моноклинной элементарной ячейкой с размерами $a=8,01$, $b=8,17$, $c=10,36$ Å; $\gamma=97,3^\circ$ (пространственная группа симметрии $P2_1$), для целлюлозы I_α предложена одноцепочечная триклинная элементарная ячейка с параметрами: $a=6,74$, $b=5,93$, $c=10,36$ Å; $\alpha=117^\circ$, $\beta=113^\circ$, $\gamma=81^\circ$ (пространственная группа $P1$) [51, 52] (Рис.1.3).

Результаты исследования структуры целлюлозы штамма *Acetobacter xylinum* ВКМ В-88 (ЦАХ) (*Gluconacetobacter xylinum* N169 GALU), синтезированной на кафедре микробиологии СПбГУ А.А. Ткаченко и являющейся объектом исследования в данной работе, показали присутствие только одной модификации I_β [54, 21]. На Рис. 1.4 представлены дифракционные картины, полученные при перпендикулярном и параллельном (на вставке) падении рентгеновского пучка относительно плоскости сухой нано-гель-плёнки. Появление в области экватора рефлекса -110 , $d=0,607$ нм ($2\theta=15^\circ$) (Рис.1.4 (вставка)), а в области меридиана рефлексов 002 ($d=0,523$ нм ($2\theta=17^\circ$)) и 004 ($d=0,259$ нм ($2\theta=35^\circ$)) указывает на формирование аксиально-плоскостной текстуры в плёночном материале в процессе кристаллизации. Слабый рефлекс на дифрактограмме в области $2\theta=20^\circ 40'$ фиксируется вблизи меридиональной плоскости и является суммарным отражением от плоскостей (102) и (012) моноклинной решетки с $d=0,437$ и $0,432$ нм.

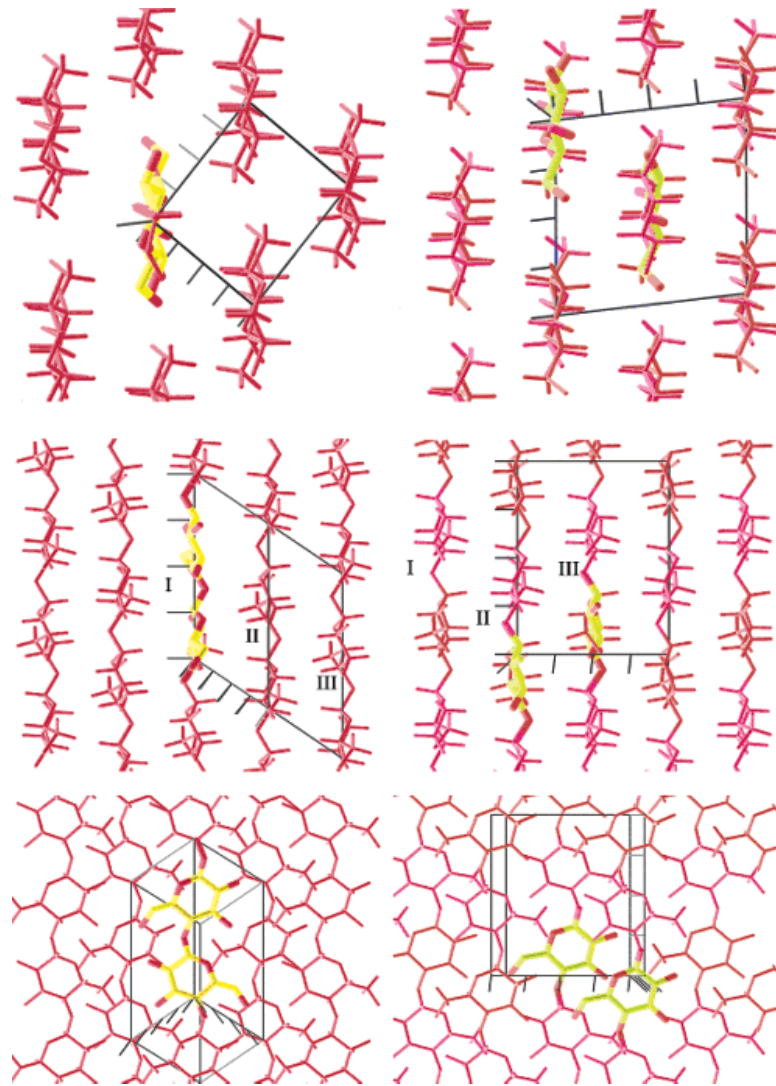


Рис.1.3.Проекция кристаллической структуры целлюлозы I_{β} (слева) и I_{α} (справа): вдоль осей цепи (верх), перпендикулярно осям цепи и в плоскости листов с водородными связями (центр), перпендикулярно листам с водородными связями (низ). Целлюлозные цепи показаны красным цветом. Асимметричная ячейка каждой структуры выполнена жирными линиями, а соответствующие атомы углерода показаны желтым цветом [53].

В районе экватора наиболее интенсивным является рефлекс с $d=0,39$ нм, соответствующий отражению от плоскостей (200), в которых располагаются водородно-связанные молекулы целлюлозных цепей, формируя параллельные слои. Рефлекс от плоскостей с $d=0,26$ нм четко фиксируется на меридиане и определяет период с полимерной цепи. Таким образом, на основании анализа

рентгеновских картин от плёнок ЦАХ был сделан вывод, что микрофибриллярные ленты, продуцируемые бактериями используемого штамма *Acetobacter Xylium*, ориентируются своей широкой гранью (-110) в плоскости высушенной плёнки, формируя аксиально-плоскостную структуру, осью которой является нормаль к плоскости плёнки [54].

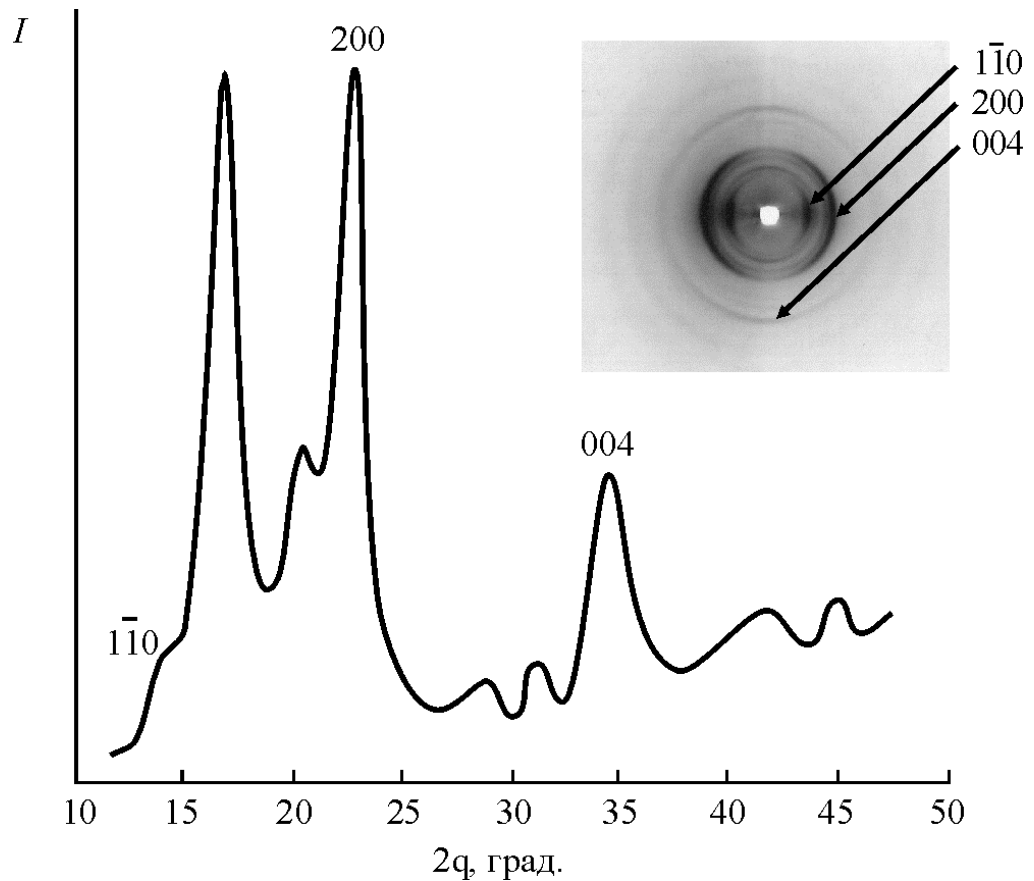


Рис.1.4. Дифрактограмма сухой пленки ЦАХ, полученная при перпендикулярном падении рентгеновского пучка и (на вставке) рентгенограмма, снятая при параллельном падении рентгеновского пучка относительно плоскости образца [54].

На электронно-микроскопических изображениях образцов можно видеть, что бактерия синтезирует целлюлозные ленты диаметром 50-60 нм и перемещается вдоль поверхности питательной среды без выделенных направлений, хотя наблюдаются достаточно протяженные практически прямолинейные участки длиной до 10 мкм (Рис. 1.5. а).

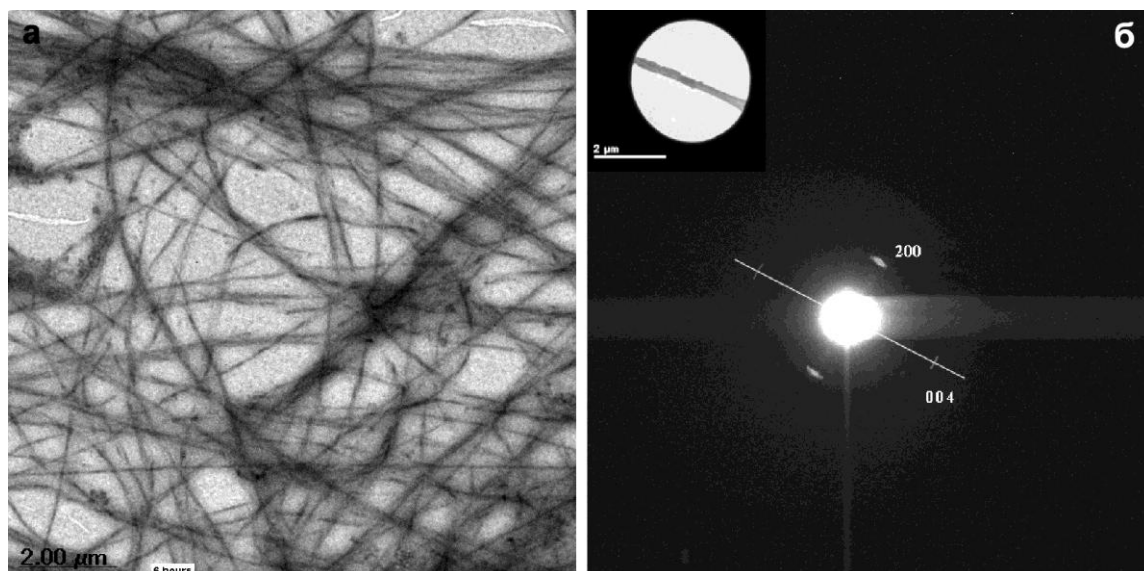


Рис.1.5.Электронно-микроскопическое изображение микрофибрилл ЦАХ (а), б – электронограмма от участка микрофибриллы (сечением <math>< 50 \text{ нм}</math>), выбранного с помощью селективной диафрагмы.[54]

На дифракционных картинах от отдельных областей единичных лент всегда фиксируется рефлекс от плоскости с $d=0,26 \text{ нм}$, ориентированный вдоль направления ленты и рефлекс с межплоскостным расстоянием $\sim 0,389 \text{ нм}$ в перпендикулярном направлении (Рис.1.5.б). Эти отражения идентифицируются как рефлексы 004 и 020/200 полиморфной модификации I_{β} . Электронно-дифракционных данных о присутствии в этих пленках полиморфа I_{α} не получено [54].

Модель строения микрофибрилл ЦАХ (ЦГХ) представлена на Рис.1.6 а. Грани моноклинной ячейки целлюлозы, которые формируют поверхность микрофибрилл, являются плоскостями (-110) и (110) . Отмечается, что размер поперечного сечения микрофибрилл зависит от вида используемого штамма бактерии и от условий синтеза [54]. Модель упаковки цепей в проекции на плоскость ab моноклинной структуры с двумя макроцепями на элементарную ячейку представлено на Рисунке 1.6. (вставка). На поверхности раздела фаз по линии A_1-A_2 располагаются группы $-C^6-OH$, которые участвуют в образовании

водородных связей между минислоями. Видно, что минислои располагаются перпендикулярно поверхности культуральной среды.

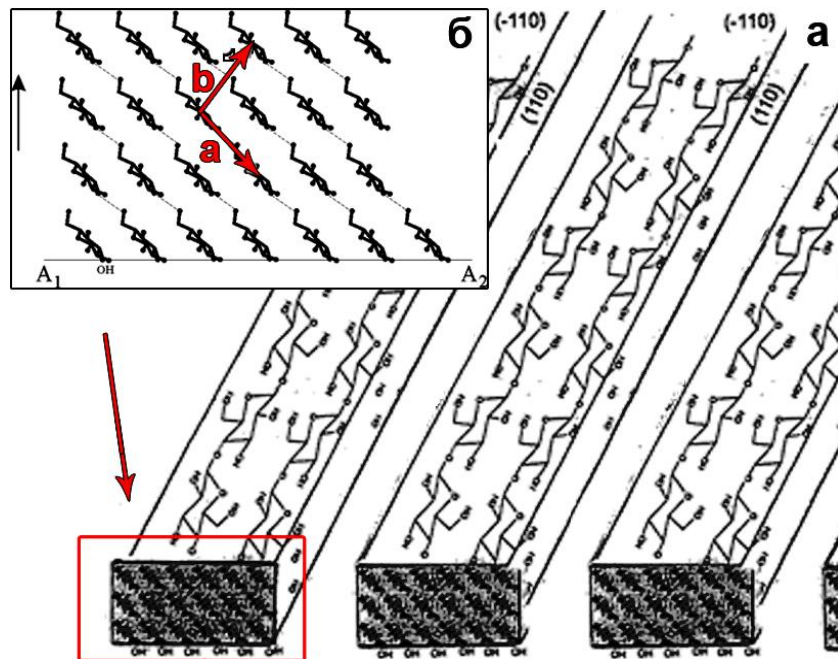


Рис.1.6. Модель упаковки целлюлозных макроцепей с указанием формирующих микрофибриллы граней (-110) и (110) и первичные ОН-группы (а). Модель упаковки целлюлозных цепей в проекции на плоскость ab для моноклинной ячейки (б). Стрелкой отмечено направление минислоев в процессе биосинтеза [21, 54].

1.3. Композиты на основе бактериальной целлюлозы

Обладая пористой и прочной архитектурой, нано-гель-пленка бактериальной целлюлозы является перспективным материалом в различных областях медицины: от раневых покрытий, искусственной кожи, искусственных кровеносных сосудов, до хрящевых и костных имплантатов [55-59].

Об использовании композитов на основе нано-гель-пленки бактериальной целлюлозы в качестве раневого покрытия написано достаточно много [60-65]. Для придания определенных свойств в нее внедряют разнообразные комплексы улучшающие свойства раневого покрытия [66], в частности комплексы с

наночастицами металлов Ag [8, 67, 68], Cu [7], AgCl [69], обладающих антимикробными свойствами, наночастицами Se, обладающими антиоксидантной активностью[5], поливинилпирролидона с фуллереном C₇₀ [70] и C₆₀ [71, 72], обладающие широким спектром биологической активности и др. Наночастицы обладают огромной удельной поверхностью, высокой адсорбционной способностью, а также биологической активностью, в то время как целлюлозная матрица в композите обеспечивают устойчивость к их агломерации и осаждению.

На данный момент существуют уже три коммерчески доступных раневых покрытия на основе исходной гель-пленки бактериальной целлюлозы: Nanoskin[®] [64], Dermafill[®] [73], Nanoderm [74]. Поэтому в последнее время возрос интерес к композитным раневым покрытиям на основе гель-пленки бактериальной целлюлозы с внедренными наночастицами различной природы.

Благодаря прочностным характеристикам нано-гель-пленка перспективна в качестве имплантата костной и хрящевой ткани [12, 75, 76]. Фибриллы/волокна целлюлозы используют в качестве армирующего материала для фосфатно-кальциевых комплексов [10, 77, 78], а также для композиционных материалов на основе таких полимеров как: желатина, хитозан, шелк и др.[79-82]. В приведенных работах отмечается, что добавление бактериальной целлюлозы приводит к повышению прочности композиционных материалов.

Обширное использование ЦГХ ставит необходимостью исследовать матрицу-носителя, а также композитные материалы на ее основе на всех этапах получения: от синтеза матрицы до готового к применению биоматериала.

1.3.1. Взаимодействие наночастиц, стабилизированных полимером, с матрицей БЦ

Для создания биокompозитов целлюлоза/наночастицы необходимо распределение наночастиц определенного размера в матрице. При получении наночастиц часто применяют реакции восстановления, в результате которых искомые объекты обладают сильно развитой межфазной поверхностью, что

может привести к последующей агрегации. Для предотвращения этого процесса используют разнообразные стабилизаторы наночастиц, которые сохраняют их определенный размер. Приготовленные коллоидные растворы затем внедряют в полимерную матрицу.

Наночастицы серебра (Ag), стабилизированные водорастворимыми синтетическими полимерами, такими как поливинилпирролидон (ПВП) [83] и полиамидные дендримеры [84], имеют узкое распределение по размерам и обладают высокой антимикробной активностью и низкой токсичностью. Поэтому они перспективны для насыщения различных перевязочных материалов с целью придания последним лечебных свойств. Так, наночастицы серебра, а также композиты на их основе обладают антимикробными свойствами к следующим видам бактерий: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibria cholera*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Syphillis typhus*, and *S.aureus* [85, 86]. Наночастицы меди, стабилизированные ПВП, также обладают устойчивостью к следующим видам бактерий: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *S. aureus* [87].

Несмотря на то что размеры наночастиц в коллоидных растворах не превышают ~100 нм, их распределение по размерам может зависеть как от выбора полимера-стабилизатора [88], так и от условий получения раствора, например от pH среды [89] или соотношения полимер/наночастицы: повышение массовой доли стабилизатора приводит к узкому распределению и уменьшению размеров частиц [90, 91].

Возможность стабилизации наночастиц различными полимерами привела к созданию коллоидных растворов на основе наночастиц селена. Селен является очень важным микроэлементом для организма: он обладает иммуностимулирующими свойствами (повышает функциональную активность лимфоцитов, например, относительно опухолевых клеток) [92, 93], индуцирует образование ферментов, выполняющих функцию антиоксидантов, захватывающих свободные радикалы [94].

Известно, что частицы аморфного нано Se^0 , стабилизированные полимерами, в отличие от кристаллического, обладают рядом таких

имуностимулирующих и антиоксидантных свойств [95], что открывает перспективу использования наночастиц в качестве наполнителя для раневых покрытий и других целей.

Природа взаимодействия наночастиц селена с разного рода макромолекулами вызывает особый интерес. Результаты электронно-микроскопических исследований показали, что частицы, образованные восстановлением Se (IV) в элементарный Se(0) в водных растворах в присутствии амфифильных полимеров не имеют классической структуры ядро-оболочка, а содержат внутри органические макромолекулы [96]. Такие композит-частицы обладают малой жесткостью, легко деформируются, будучи собраны в агломераты или под воздействием сил поверхностного натяжения.

В зависимости от полимера-стабилизатора композит-частицы могут иметь аморфную или кристаллическую структуру [96], а изменение мольного соотношения заряженных субединиц в растворах полиэлектролитных комплексов позволяет получать функционализированные наночастицы полимер/селен с различными размерными и структурно-морфологическими характеристиками, что составляет физико-химическую основу целенаправленного синтеза новых фармакологически активных веществ [97].

Наиболее распространенным и простым способом получения композитов на основе нано-гель-пленки ЦГХ является сорбция наночастиц в целлюлозу путем опускания отжатой пленки в коллоидный раствор с комплексами наночастиц [6]. В ранее проведенных работах по изучению процессов сорбции и десорбции наночастиц методами рентгеновской дифракции было показано, что частицы аморфного серебра, стабилизированные поливинилпирролидоном [88], а также аналогичные комплексы селена [98], достаточно легко сорбируются в гель-пленку бактериальной целлюлозы. При этом структура матрицы остается неизменной, в отличие от структуры наночастиц Se^0 , которые в присутствии гель-пленок бактериальной целлюлозы начинают кристаллизоваться. В работе [96] отмечается кристаллизация аморфных наночастиц селена, стабилизированных ПВП и поли(2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновой) кислотой (ПАМПС), в моноклинную

модификацию после добавления в систему нано-гель-пленки целлюлозы *Acetobacter xylinum*.

Изучение взаимодействий таких водорастворимых наносистем, содержащих одновременно серебро и селен, с целлюлозной матрицей открывает перспективу создания новых гидрофильных непылящих перевязочных материалов с низкой адгезией к раневой поверхности, обладающих антимикробной, антивирусной, противоопухолевой, противовоспалительной и репаративной активностью.

1.3.2. Композиты с нанокристаллами гидроксиапатита (ГАП): получение, структура и свойства

Внимание к созданию искусственных композитных материалов, приближенных к естественной костной ткани, стремительно растет и важной проблемой является получение композита, который был бы максимально близок по структуре и свойствам к своему естественному аналогу. Лидирующая роль отдается композиционным материалам на основе природных полимеров (синтетический коллаген, хитин, хитозан, шелк, целлюлоза и др.) в качестве заменителя коллагена и нанокристаллов гидроксиапатита, как основной минеральной составляющей естественной костной ткани.

Отметим, что благодаря прочностным характеристикам (прочность на разрыв гель-пленки бактериальной целлюлозы составляет ~ 10 ГПа) она может служить перспективной основой прекурсора кости.

1.3.2.1. Структура и свойства естественной костной ткани

Костная ткань представляет собой композиционный материал, состоящий из органической и неорганической составляющей. Органическими составляющими костной ткани являются коллаген и протеогликаны (25 мас. %). Эти белки образуют межклеточный матрикс, в котором выстраиваются апатитовые структуры. Коллаген придает тканям организма необходимую механическую

прочность при деформациях типа растяжения и изгиба. Прочность (твердость, жесткость,) костной ткани на сжатие обусловлена ее неорганической минеральной составляющей (65 мас. %)– биологическим апатитом $(Ca, Na, Mg)_{10}(PO_4, HPO_4, CO_3)_4(OH, F, Cl)_2$, который можно представить как кальцийдефицитный гидроксиапатит (КГА) с катионными (магний, натрий) и анионными (карбонатные группы, хлор и фтор) замещениями.

Выделяют несколько структурных уровней организации костной ткани (Рис.1.7).

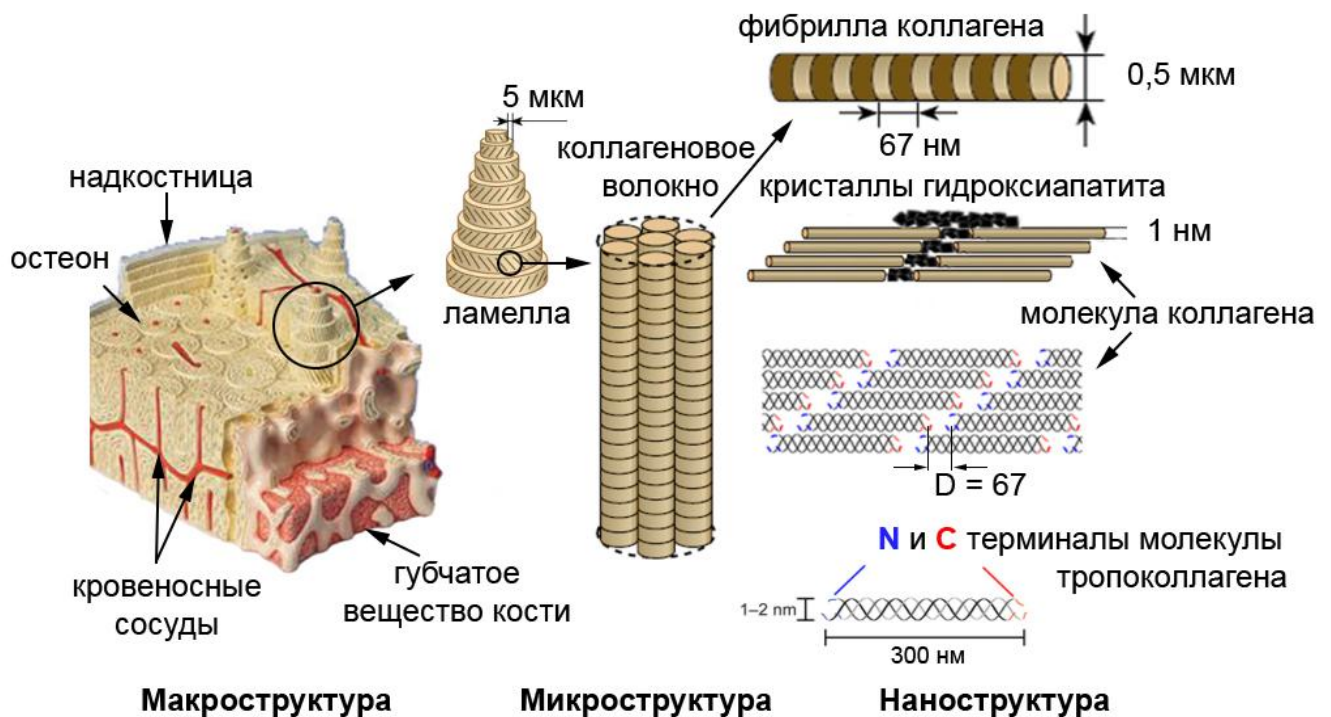


Рис.1.7. Модель строения костной ткани. Иерархические уровни организации костной ткани от микро- до молекулярного уровня.

Остеон считается самой высшей структурной единицей костной ткани и представляет собой конструкцию из 5-20 концентрически расположенных ламелл с разными направлениями и углами навивки. Ламелла в свою очередь образуется благодаря соединению коллагеновых фибрилл в пластинки или цилиндрические оболочки. В каждой ламелле волокна параллельны друг другу. Волокна коллагена диаметром 100-2000 nm образованы различимыми в электронном микроскопе

фибриллами, которые состоят из вытянутых в длину макромолекул тропоколлагена, содержащих три скрученные спирально полипептидные нити. В фибриллах тропоколлаген располагается рядами, последовательно смещенными на $\frac{1}{4}$ один по отношению к другому [99, 100, 101].

Костная ткань постоянно перестраивается, в ней происходят многие обменные процессы с участием сотен клеток, поэтому воспроизвести морфологию костной ткани достаточно сложно. В настоящее время в связи с развитием методов электронной микроскопии появилась возможность исследовать костную ткань на наноуровне. Если в начале века существовали лишь предположения о процессах происходящих в костной ткани, то за последние годы многие из них удалось экспериментально либо доказать либо опровергнуть.

Известно, что биологический апатит формируется в промежутке между концом одной молекулы коллагена и началом следующей, который служит центром кальцификации при формировании кости. С помощью метода криогенной просвечивающей электронной микроскопии и криогенной электронной томографии удалось показать, что коллаген выполняет не только роль каркаса, а совместно с ингибиторами активно контролирует процесс минерализации (Рис.1.8). Положительный заряд, созданный рядом с С-терминалом молекулы тропоколлагена, способствует проникновению аморфного фосфата кальция (АФК) внутрь фибрилл. Кроме того скопление заряженных аминокислот как в области щели, так и в области перекрытия образует центры кальцификации, контролируя при этом переход от АФК к массиву параллельно ориентированных апатитовых кристаллов[102]. Кристаллы апатита обнаружены в АФК-области (отмечена черной стрелкой), которая проникает внутрь фибриллы. На вставках 2-5 видно, что кристаллы апатита начинают образовываться на темных полосах, впоследствии увеличиваясь в размерах (Рис.1.8.).

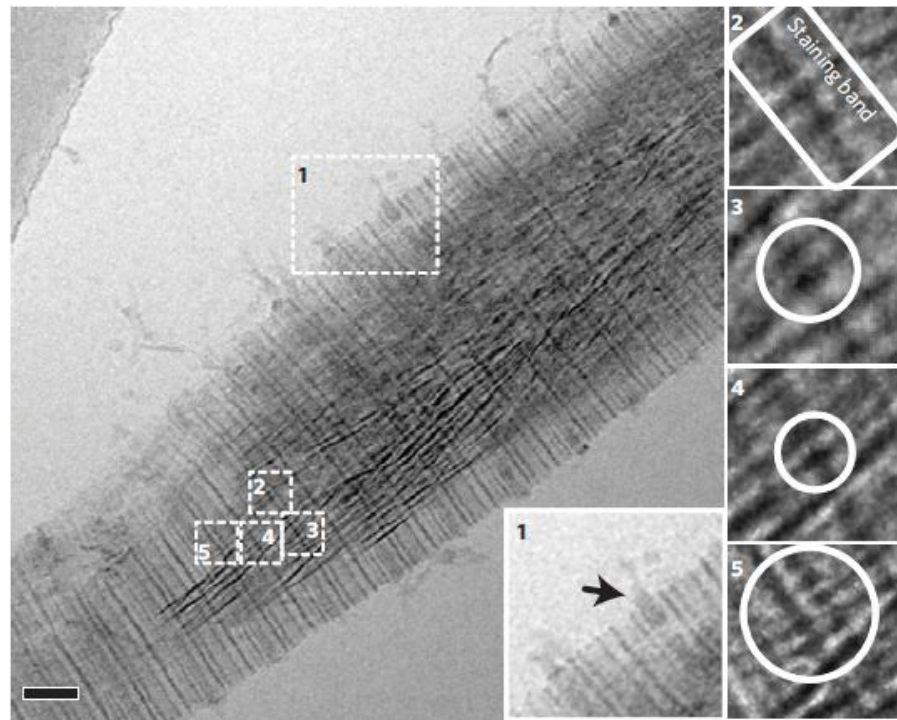


Рис.1.8. КриоПЭМ-изображение фибриллы коллагена I типа, полученного из сухожилия лошади (время минерализации – 48 часов) [102].

На полученных микрофотографиях продольных и поперечных срезов бедренной кости человека видно, что в межфибрилярных пространствах объединения кристаллитов, прилегающие к коллагеновым фибриллам, окружают их, формируя манжетки (Рис.1.9. а, б) [103]. На отдалении от коллагеновых фибрилл кристаллиты образуют конгломераты, в которых они ориентированы в одном направлении. Электронограммы от обоих срезов, соответствуют характерной картине электронной дифракции от гидроксиапатита. На Рисунке 1.9 в можно увидеть, что рефлексы 002 и 004 состоят из двух дуг, которые стягиваются углами 36° . Угловое распределение дуг отвечает угловому распределению нанокристаллов ГАП на микрофотографии (Рис.1.9 а). На электронограмме поперечного среза (Рис.1.9. г) рефлексы 001 отсутствуют, что свидетельствует об их перпендикулярной ориентации к плоскости среза. По отношению друг к другу кристаллиты гидроксиапатита расположены под разными углами.

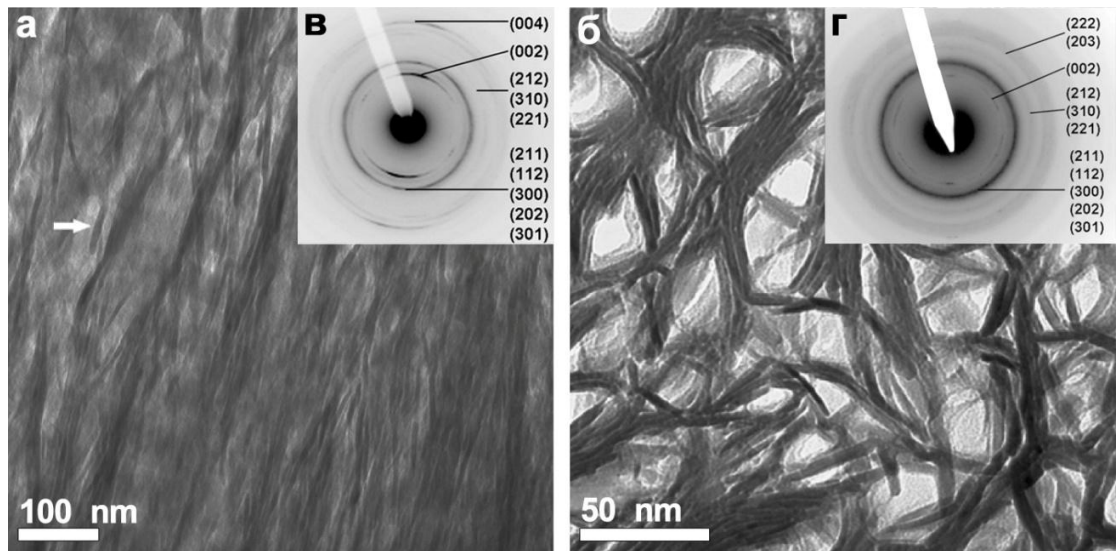


Рис.1.9. ПЭМ-изображения продольного (а.) и поперечного (б) срезов бедренной кости человека и электронограммы, полученные от соответствующих областей образца (в, г) [103].

Модель расположения минеральной компоненты относительно коллагеновых фибрилл представлена на Рис.1.10.а. Внутрифибриллярные объединения кристаллитов образуют ряд параллельных спирально (винтообразно) закрученных пластов (Рис. 1.10.б.). Угол наклона этих винтовых структур к оси фибриллы составляет $8-25^\circ$ [103]. Отдельные объединения минералов связывают соседние пласты, обеспечивая непрерывность минерального компонента фибрилл. При этом около 30% минеральной фазы кости находится в промежутках между молекулами тропоколлагена (внутрифибриллярно), и значительная часть (около 70%) кристаллов локализована на поверхности фибрилл (межфибриллярно) [104].

В последнее десятилетие детализированы не только характер и пространственная организация связей между органическими и минеральными структурами, но и особенности их иерархического построения. Эти данные позволяют говорить о новом представлении модели костной ткани, которая представляет собой трехфазную наноразмерную модель, где еще одним важным элементом является гидратный слой воды, обволакивающий кристаллы гидроксиапатита в костной ткани. Предполагается, что именно он лежит в основе механизма, определяющего жесткость и прочность костных структур [105,106].

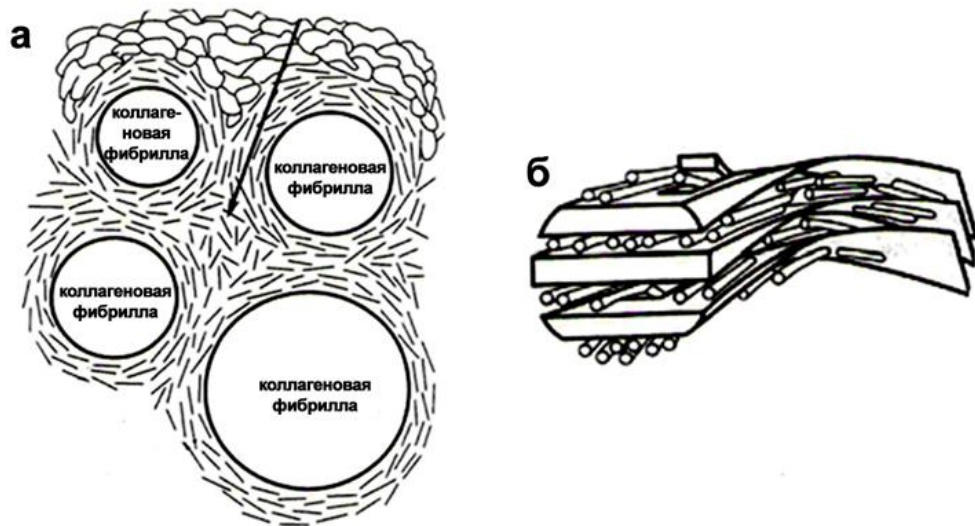


Рис.1.10. Модель распределения объединений кристаллитов гидроксиапатита в костной ткани: межфибрилярное объединение кристаллитов (а), справа – внутрифибрилярное (б) [104].

В настоящее время с применением таких методов как атомно-силовая микроскопия и высокоразрешающая электронная микроскопия стало очевидным, что кристаллы костной ткани имеют пластинчатую форму длиной ~20 - 60 нм, шириной ~ 10 - 30 нм и толщиной ~1,5 – 5 нм. Они ориентированы таким образом, что их продольная ось параллельна оси фибрилл коллагена. Существует зависимость между структурой кристаллов ГАП и возрастом, обменом минералов, физической нагрузкой, состоянием коллагеновой матрицы и рядом других факторами.

Скорость обмена между костью и средой определяется размерами кристаллитов минерального вещества кости, представляющего собой систему с огромной поверхностью. Подсчитано, что активная поверхность 1 грамма костной ткани составляет 130 – 260 м² [101].

Еще одним важным свойством кости является наличие в ней системы пор размерами 100-300 и 10-50 мкм в кортикальной костной ткани и 200-600 мкм в трабекулярной (губчатой) костной ткани. Плотная и компактная кортикальная ткань составляет внешнюю часть всех скелетных структур. Трабекулярная костная ткань находится внутри длинных костей. Такая ткань представляет собой

сеть из тонких костных элементов- трабекул. Пористость, степень кристаллизации, ориентация волокон коллагена определяют механические свойства кости, которые могут служить ориентиром при разработке материалов, предназначенных для изготовления имплантатов [100]. Основные данные по механическим характеристикам кортикальной и трабекулярной костной ткани представлены в Таблице 1.1.

Таблица 1.1. Механические свойства кортикальной и трабекулярной костных тканей [100].

Свойство	Кортикальная костная ткань	Трабекулярная костная ткань
Прочность при сжатии, МПа	100-230	2-12
Прочность при изгибе и растяжении, МПа	50-150	10-20
Деформация до разрушения, %	1-3	5-7
Трещиностойкость, МПа·м ^{1/2}	2-12	-
Модуль Юнга, ГПа	7-30	0.05-0.5

1.3.2.2. Гидроксиапатит: структура и свойства

Благодаря составу, структуре и уникальным физико-биологическим характеристикам материалы на основе гидроксиапатита находят широчайшее использование в медицине в виде керамики, цементов и композитов. Их используют при восстановлении дефектов костной и зубной ткани и операциях на позвоночнике, как глазные и ушные имплантаты, в костной пластике при челюстно-лицевых операциях, в виде покрытий металлических имплантатов и др. [107-109].

Кристаллическая структура ГАП ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) чаще всего описывается в рамках гексагональной ячейки с параметрами: $a=b=9,432 \text{ \AA}$ и $c=6,881 \text{ \AA}$ (рис.1.11.а) [110]. Характерной особенностью кристаллов гидроксиапатита как и октакальций фосфата является высокая степень анизотропии и значительная

скорость роста вдоль направления $[0001]$ с образованием сильно вытянутых тонких пластинок (рис.1.11.б) $[111, 112]$. Анализ литературных данных показывает, что в последнее время большое внимание уделяется наноразмерным и нанокристаллическим апатитам (их синтезу и структуре) $[111,113,114]$.

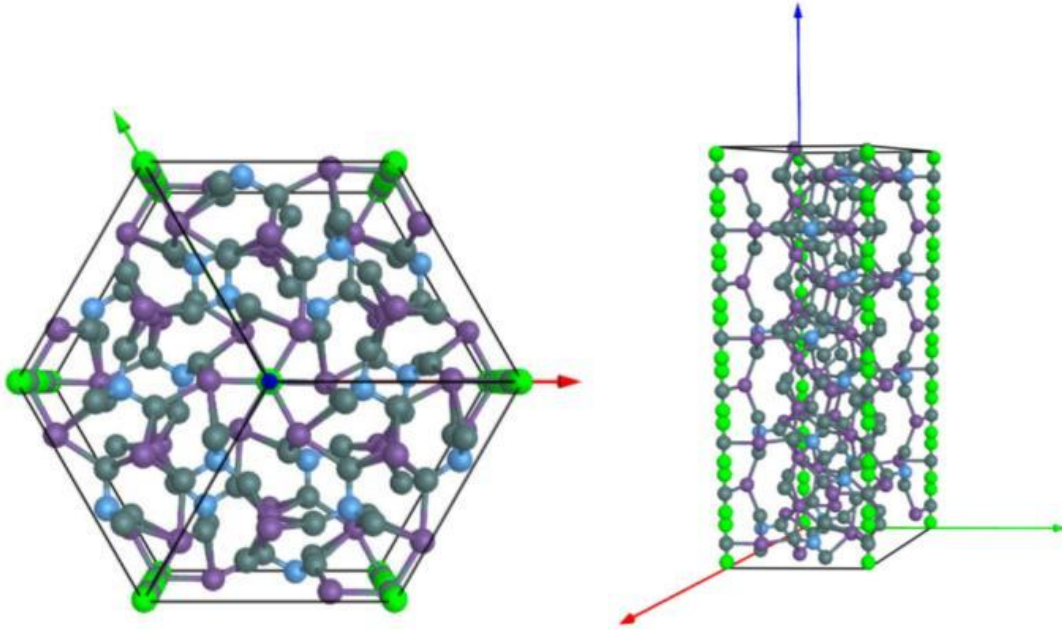


Рис.1.11. а) - проекция ячейки гидроксиапатита на плоскость (0001) , б)- удвоенная элементарная ячейка вдоль направления $[0001]$.

Нанокристаллические материалы обладают большой поверхностной площадью, находятся в динамическом равновесии с биологическим окружением в цикле ремоделирования/минерализации и проявляют высокий уровень механических свойств.

Достаточно много публикаций посвящено получению нанокристаллов гидроксиапатита и карбонат-замещенного гидроксиапатита, а также влиянию параметров синтеза (температуры, концентрации ионов кальция, времени и т.д.) на их форму, размер, стехиометрию, а также поверхность наноразмерных частиц. Благодаря разнообразию методов синтеза в литературе известны данные о получении сферических, мезопористых, пластинчатых, игольчатых апатитовых наночастиц, а также наностержней $[112, 115-117]$.

До недавнего времени в определении структуры синтезированных наночастиц ГАП было много неясностей. Отсутствие четких пиков на

дифракционных картинах вводило многих исследователей в заблуждение о кристалличности исследуемого объекта. С развитием электронномикроскопических методов, в частности метода высокоразрешающей электронной микроскопии, удалось определить, что наночастицы ГАП имеют монокристаллическую структуру [112, 118 - 119].

В медицинской практике наиболее широко используются керамические материалы на основе кальцийфосфатных соединений (гидроксиапатита, карбонатсодержащего ГА, октафосфатакальция) в форме плотных и пористых блоков и гранул. В качестве примера можно привести материалы марки ReproBone™ [120], OsteoSet™, Pro-Dense™ [121].

На Химическом факультете МГУ была создана методика синтеза наногидроксиапатита [116], особенностью которого является не только полная биосовместимость с организмом человека и животных, но и высокая биологическая активность в процессах остеосинтеза, что было подтверждено клиническими испытаниями [122, 123]. По результатам данного исследования разработана промышленная технология синтеза нано-ГАП [124,125], которая с успехом применяется для производства серии медицинских препаратов под маркой «ОСТИМ», а также профилактической зубной пасты «ПАРОДОНТОЛ» (фабрика «Свобода»).

Однако возможности применения нано-ГАП подобного типа не ограничиваются использованием его в чистом виде. Для имплантатов, несущих механическую нагрузку, целесообразно использовать плотно спеченную керамику, обладающую большей прочностью по сравнению с пористой керамикой. Для плотной керамики общепринятыми являются такие характеристики, как прочность при изгибе и растяжении, трещиностойкость. (Таблица 1.2).

Большой разброс величин для соответствующих характеристик связан с остаточной пористостью и присутствием примесей. Керамика на основе ГАП характеризуется довольно низкой стойкостью к распространению трещин и большим разбросом экспериментальных значений прочности от образца к

образцу. Влажная среда, имитирующая среду организма, лишь усугубляет эти отрицательные свойства керамики [126].

Таблица 1.2. Некоторые механические характеристики керамических материалов при комнатной температуре.[127]

Материал	Прочность при сжатии, МПа	Прочность при изгибе/растяжении, МПа	Деформация до перелома, %	Модуль Юнга, ГПа
Кортикальная кость	100-230	50 -150	1-3	7-30
ГАП-керамика (плотная)	120-150	38-300	-	35-120
ГАП керамика (пористая)	500-1000	115-200	-	80-110
Стеклокерамика	1080	215	-	118

Известно большое число исследований по технологии пористой керамики. Пористая керамика, хотя и обладает достаточной прочностью на сжатие (2-100 МПа), но имеет предел прочности при изгибе 2-11 МПа, что в два-три раза меньше необходимых значений, причем с увеличением пористости прочность материала резко снижается. Прочность постепенно увеличивается, когда кость прорастает во внутрь сети пор имплантата [126].

Хрупкость керамики и высокая чувствительность к коррозии под напряжением в жидкостях организма, приводящая к замедленному разрушению имплантата обуславливает достаточно узкую область ее применения: ее можно использовать только для замещения небольших участков костей (бедер, коленей, зубов), а также сухожилий и связок, в челюстно- лицевой хирургии, в качестве покрытий биоимплантатов, а также при локализованной доставке лекарств [128]. В таблице 2 представлены механические свойства некоторых керамических

материалов. На данном этапе не существует керамических материалов приближенных по механическим свойствам к костной ткани.

Для замены большого дефекта кости, то до сих пор наилучшими материалами для создания ортопедических устройств опорно-двигательного аппарата, подвергающихся механическим нагрузкам, являются биоинертные материалы (металлы и сплавы с ФК покрытием, обеспечивающим биологическую совместимость и способность к биоинтеграции имплантата в костную ткань) [100]. Однако главной проблемой является устойчивость таких покрытий к резорбции. Отмечается, что важную роль при этом играют фазовый состав, морфология отдельных кристаллов, а также свойства текстурированных форм, в которые эти кристаллы объединяются [129].

1.3.2.3. Композиты на основе БЦ и нанокристаллов ГАП

Стремление улучшить механические характеристики кальций-фосфатной керамики привело к созданию композиционных материалов на основе фосфатов кальция и различных полимеров [130].

В работах зарубежных и отечественных авторов приводится большое количество способов изготовления органо-неорганических композиционных материалов — прекурсоров костной ткани: диспергирование частиц ФК в полимерной матрице, осаждение ФК на поверхность полимера (биомиметический подход) и др. Такие материалы могут оказаться ближе по всем характеристикам к костной ткани, чем спеченная керамика. Однако, для их получения необходим тщательный подбор и всесторонний контроль синтезированных исходных компонентов различного состава.

В качестве органической составляющей композитов используют: коллаген [131], хитин [132], хитозан [133], желатину [134,135], хлопок [136], шелк [137], бактериальную целлюлозу [138-141], а также синтетические полимеры: полилактиды, полигликолиды, поликапролактон, полиамиды, и др. [142-144]. Особый интерес представляют обзоры [145-147], в которых отмечаются широкие

возможности применения для практических целей наноцеллюлозных материалов и композитов на их основе.

Наряду с другими природными полимерами бактериальная целлюлоза обладает уникальными физико-химическими и сорбционными характеристиками, что делает ее перспективным материалом в качестве основы костного имплантата.

Композитные материалы на основе бактериальной целлюлозы и гидроксиапатита (ЦГХ/ГАП) исследуются и апробируются во многих странах мира. Биосовместимость таких композитов подтверждена многим *in vitro* и *in vivo* исследованиями [9, 148 - 151].

Наибольший интерес в исследованиях композитов на основе ЦГХ/ГАП связан с моделированием материал близкого к костной ткани и улучшением биологических свойств композитов ЦГХ/ГАП.

Широко распространенным и подробно описанным методом получения композита ЦГХ/ГАП является метод биоминерализации (имитация процесса образования минеральной составляющей в естественной костной ткани): последовательным опусканием нано-гель-пленки ЦГХ в жидкость, близкую по составу к плазме крови человека [152- 157]. В таких композитах наночастицы ГАП располагаются преимущественно на поверхностных фибриллах гель пленки ЦГХ, проникая внутрь в небольшом количестве. Этого эффекта удастся избежать при уменьшении толщины нано-гель-пленки ЦГХ и соответственно размеров самого композита. Однако придать образцу необходимую форму из такого материала достаточно сложно, так как хотя гель-пленка и обладает эластичностью, но является трудно формируемым материалом. В работах последних лет в качестве основы композитного материала используют порошок или водную суспензию ЦГХ [158, 159], в результате чего получается более гомогенный материал. Однако, значительное нарушение структуры нано-гель-пленки ЦГХ приводит к ухудшению механических характеристик композитов [159].

Возможности изменений структуры гель-пленки за счет изменения условий ее культивирования открывает новые возможности в области создания новых композиционных материалов на основе целлюлозы. В работе [148] показано, что

добавление гидроксиапатита и карбоксиметилцеллюлозы в среду культивирования ЦГХ привело к улучшению биосовместимости и остеокондуктивности гель-пленки целлюлозы.

Для улучшения характеристик бикомпозитов используют не только разные способы приготовления и изменение соотношения компонентов, а также варьируют компонентами и их количеством, добиваясь наиболее подходящего результата. Каждая биологическая ткань имеет свои структурные и механические характеристики. Выбор материала для имплантации – достаточно сложная задача, поскольку структура, а также свойства кости не одинаковы на всем ее протяжении. Кроме этого необходимо вводить поправки на тип кости, возраст, пол пациента и др. Таким образом, ближайшее будущее биоматериалов для имплантации будет создание материала с управляемыми характеристиками, которые будут отвечать потребностям пациента в каждом конкретном случае.

Из вышесказанного следует, что для определения оптимальных условий получения, отвечающих предъявляемым к названным материалам требованиям, таким как чистота, безопасность, эффективность и т.п., необходимо иметь подробную информацию о структуре композита в целом и каждого его компонента, что в свою очередь требует выбора адекватных методов исследования структуры как полимерной матрицы, так и включенных в нее наночастиц на всех этапах формирования.

В настоящей работе был выполнен комплекс структурных исследований композитов на основе целлюлозы *Glucanacetobacter xylinus* и наноконплексов на основе селена, а также нанокристаллов гидроксиапатита.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и приготовление образцов для исследований

2.1.1. Целлюлоза *Gluconacetobacter xylinus* (ЦГХ)

В данной работе для получения композитов на основе целлюлозы *Gluconacetobacter xylinus* (ЦГХ), в качестве матрицы была использована как исходная нано-гель-пленка ЦГХ синтезированная в процессе статического культивирования (соотношение сухого полимера и воды 1:100) так и водная суспензия на основе дезинтегрированной гель- пленки ЦГХ. Нано-гель-пленка необходимой толщины формировалась в процессе статического культивирования ее биосинтеза на питательной среде составом: глюкоза 2%, дрожжевой экстракт ДЭ-0,5 %, пептон – 0,5%, лимонная кислота 0,15% Na_2HPO_4 -0.27% [3]. Культивирование бактерий прекращали после достижения необходимой толщины гель-пленки, которую затем отмывали от остатков культуральной среды дистиллированной водой и обрабатывали кипячением в 0.5%-ном растворе NaOH для удаления нецеллюлозных компонентов с последующим тщательным промыванием в дистиллированной воде. На Рис.2.1.a приведена фотография очищенной нано-гель-пленки целлюлозы *Gluconacetobacter xylinus*. Для дальнейшего описания морфологии поверхностей ЦГХ будут использованы обозначения: верхняя поверхность (обращенная вверх в питательном растворе), нижняя поверхность (обращенная вниз в питательный раствор), боковая поверхность. Дезинтегрирование нано-гель-пленки осуществляли в блендере при скорости вращения ножей от 2000 до 15000 об/мин в течении 15 минут. Фотография суспензии на основе дезинтегрированной нано-гель-пленки ЦГХ приведена на Рис. 2.1 б.

Для проведения исследований нано-гель- пленки ЦГХ, а также суспензии на ее основе, помещали в чашку Петри и высушивали при комнатной

температуре. Фотографии высушенных пленок исходной и дезинтегрированной ЦГХ приведены на Рис. 2.2 (а, б).

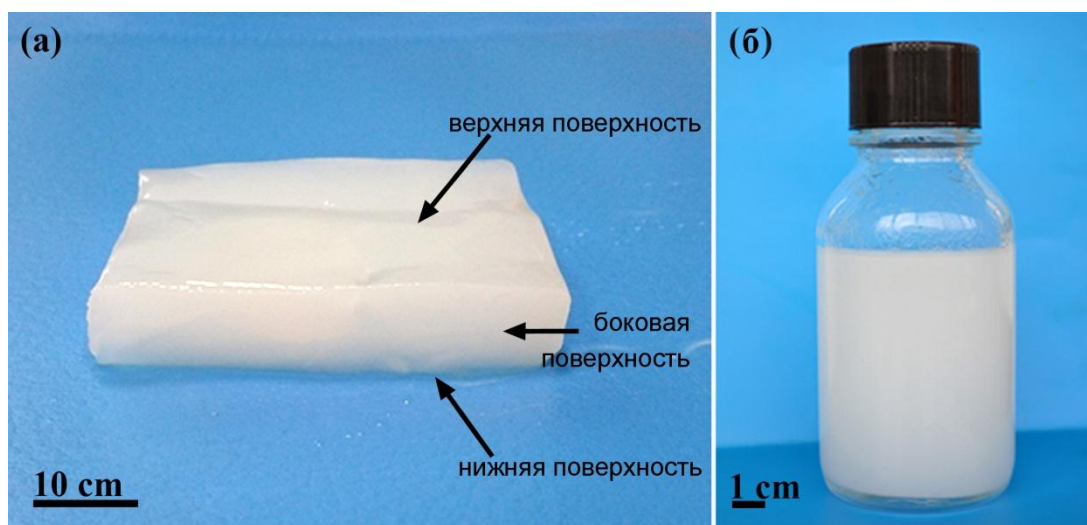


Рис.2.1. Фотография nano-гель-пленки ЦГХ с указанием верхней, боковой и нижней поверхностей (а), а также суспензии дезинтегрированной nano-гель-пленки ЦГХ (б).

2.1.2. Наночастицы селена и композиты nano-гель-пленка ЦГХ/nano-селен

Синтез наночастиц Se проводили восстановлением селенистой кислоты аскорбиновой кислотой в присутствии поливинилпирролидона (ПВП) по известной методике [5], массовое соотношение полимер/элемент - 10:1.

Получение коллоидного раствора, содержащего одновременно ионы селена и серебра, осуществляли путем добавления следовых примесей серебра в процессе синтеза наночастиц селена. При этом варьировали концентрацию ПВП-Se: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1%.

Для приготовления композитов на основе ЦГХ и частиц из раствора nano-гель-пленку ЦГХ отжимали и помещали в раствор с частицами, стабилизированными ПВП. Время сорбции - 15 минут. Фотографии высушенных пленок на основе ЦГХ/ПВП-nano-Se/Ag с разной концентрацией ПВП/Se в растворе приведены на Рис.2.2 (в, г).

Для изучения структуры и состава наночастиц композиты высушивали, закрепляли в эпоксидной смоле и с помощью микротомы LKB-III скалывали тонкие поперечные срезы. Толщина срезов составляла 70-100 нм.

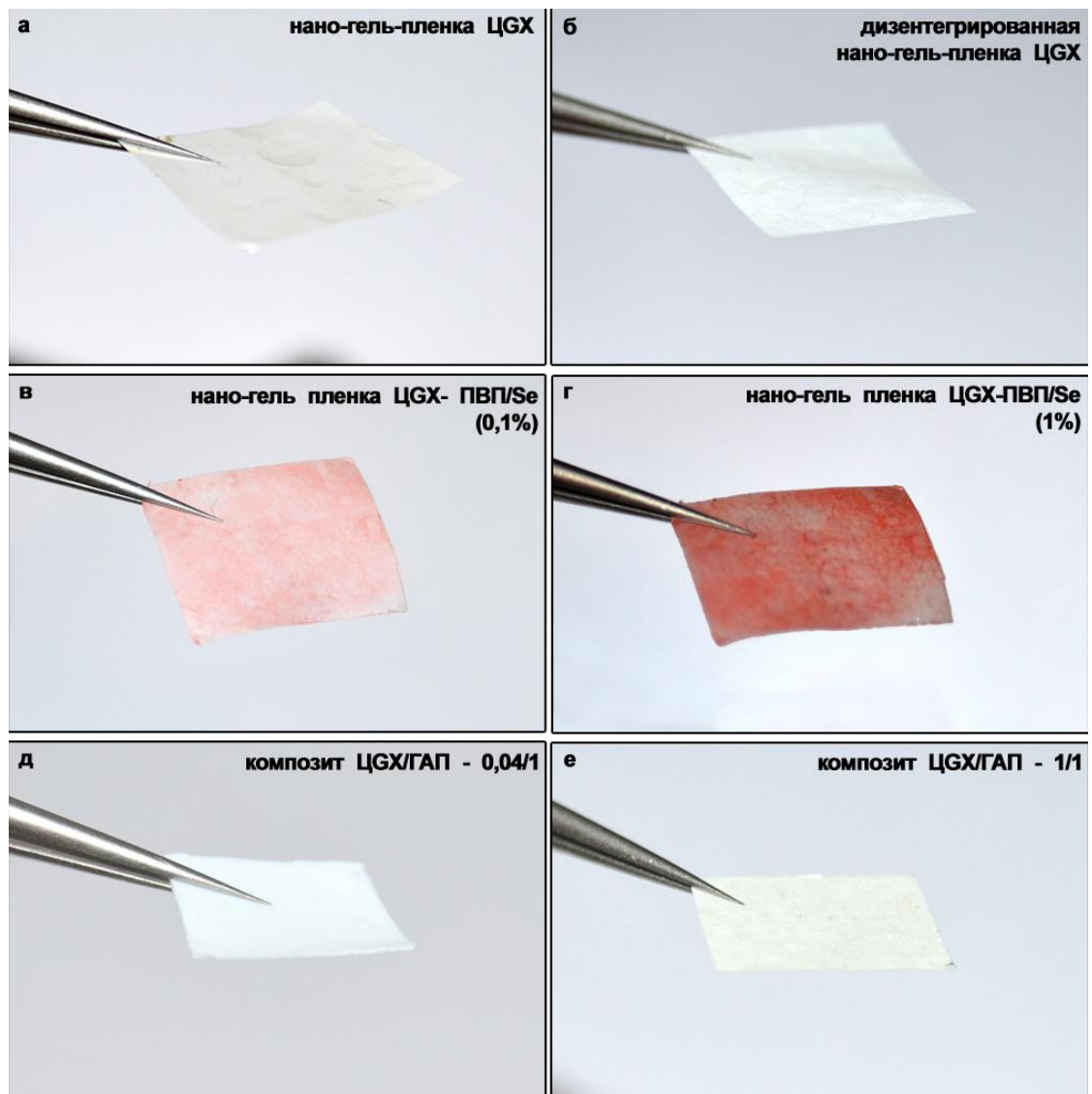


Рис. 2.2. Фотографии высушенных пленок исходной – (а) и дезинтегрированной ЦГХ – (б), ЦГХ/нано-Se/Ag с концентрацией в растворе 0,1% – (в) и 1% – (г), ЦГХ/ГАП с соотношением компонентов 1/25 – (д), 1/1– (е).

2.1.3. Нанокристаллы гидроксиапатита и композиты на основе ЦГХ и ГАП

Синтез ГАП $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ осуществляли путем постепенного добавления при стехиометрическом соотношении $\text{Ca/P}=1.67$ раствора фосфорной кислоты с

концентрацией $\text{H}_3\text{PO}_4=7.93$ моль/л в водную суспензию СаО. Массу навески СаО и количество воды рассчитывали таким образом, чтобы при постоянном интенсивном перемешивании в результате реакции образовывалась 5%-ная суспензия целевого продукта. Контроль за синтезом осуществляли по изменению рН раствора; реакция считалась законченной при достижении рН =6,5-7 [116].

Композиты ЦГХ/ГАП получали тремя способами:

- i) механическим смешиванием водных суспензий нанокристаллов гидроксиапатита и нано-гель-пленки ЦГХ/ГАП,
- ii) путем проведения синтеза наночастиц гидроксиапатита в присутствии фибриллярных фрагментов суспензии ЦГХ,
- iii) путем проведения синтеза целлюлозы GX при введении в питательную среду ГАП.

Во всех способах случаи брались идентичные массовые соотношения компонентов ЦГХ/ГАП: 1/25; 1/4; 1/1.

В первом случае совместное дезинтегрирование водных суспензий целлюлозы GX и наночастиц гидроксиапатита проводили в лабораторном блендере в течение 15 минут при скорости вращения ножей 2000 об/мин.

Второй способ получения композитных материалов основан на проведении синтеза ГАП при добавлении в раствор суспензии бактериальной целлюлозы. Для получения образцов с разными соотношениями компонентов брали известное количество суспензии дезинтегрированной бактериальной целлюлозы, доводили объем реакционной смеси до 150 мл с помощью дистиллированной воды и вносили при интенсивном перемешивании навеску оксида кальция. Навески компонентов рассчитывали таким образом, чтобы после завершения химической реакции образования гидроксиапатита в итоговом композите массовые соотношения ЦГХ/ГАП составляли величины 1/25, 1/4 и 1/1 (г/г). Полученную смесь гомогенизировали в течение еще 5 мин, а затем осуществляли синтез наночастиц ГАП по методике, описанной выше, путем добавления через специальный керамический капилляр фосфорной кислоты (с заданной скоростью ~ 1мл/мин, концентрация $\text{H}_3\text{PO}_4=7.93$ моль/л) в полученную водную суспензию

ЦГХ и $\text{Ca}(\text{OH})_2$ до достижения стехиометрического соотношения $\text{Ca/P} = 1.67$. Реакция считалась законченной при достижении $\text{pH} = 6,5-7$. При дальнейшем увеличении доли ЦГХ в композите синтез не осуществим, поэтому для приготовления композита с массовой долей ЦГХ больше доли гидроксиапатита, к композитной суспензии ЦГХ/ГАП– 1/1 добавляли суспензию бактериальной целлюлозы, взятой в таком количестве, чтобы получить массовое соотношение ЦГХ/ГАП – 2,5/1.

В случае применения способа введения ГАП в питательную среду при синтезе ЦГХ синтез нано-гель-пленки проводили по традиционной методике в процессе статического культивирования в питательной среде, содержащей нанокристаллы ГАП. По завершению биосинтеза пленки обрабатывали стандартным кипячением в 0,5% водных растворах NaOH с его многократной сменой до отсутствия азота и затем тщательно промывали дистиллированной водой.

Композитные пленки ЦГХ/ГАП толщиной до 0,05 мм получали методом полива на чашку Петри и затем высушиванием их при комнатной температуре. Фотографии высушенных пленок на основе ЦГХ/нано-ГАП, полученных первым способом с разным массовым соотношением компонентов представлены на Рис.2.2 (д, е).

2.2. Методы структурной диагностики

Выбор методов структурной диагностики всегда диктуется необходимостью исследования разных параметров образца: характеристикой структуры от макро до наномасштаба вплоть до атомного уровня, необходимостью получения изображений, как от отдельных составляющих, так и от композита в целом. Поэтому получение наиболее обширной информации об образце требует комплексного подхода.

2.2.1. Рентгеновская и электронная дифракция

Геометрическая теория дифракции не зависит от типа излучения, поэтому теория дифракции, первоначально описанная для рентгеновских лучей [18,160] может также описывать дифракцию электронов [17, 161]. Принципиальное различие этих методов в природе рассеяния излучения атомами материала, которое принято описывать в терминах фактора атомного рассеяния f .

Рентгеновские лучи с длиной волны 0.05 – 0.3 нм рассеиваются электронными оболочками атомов. И анализ экспериментальных данных, полученных с помощью рентгеновских лучей, описывает распределение электронной плотности в кристалле с максимумами, отвечающими расположению атомов.

Электроны рассеиваются на электронном потенциале атомов, который создается положительно заряженными ядрами и отрицательно заряженными электронными оболочками вокруг ядер. Распределение электростатического потенциала близко к распределению электронной плотности, однако спадает более гладко с увеличением расстояния от ядра. Анализ электронно-дифракционных данных сводится к описанию распределения потенциала в кристалле с максимумами, отвечающими расположению атомов.

Длина волны электрона λ (нм) с учетом релятивистских поправок, которые позволяют более точно находить значение волны для потенциала > 60 В, имеет вид:

$$\lambda = \frac{1.226}{\sqrt{V_0(1+0.9788 \cdot 10^{-6} V_0)}} \quad (2.1)$$

Основные положения структурного анализа

В общем случае падающая на объект волна возбуждает в каждом элементарном объеме материала вторичную волну и амплитуда рассеяния волны зависит от рассеивающей способности данного элементарного объема.

Уравнение движения электрона может быть описано волновым уравнением Шредингера

$$\nabla^2 \Phi + \frac{8\pi^2 m}{h^2} (E - U(r)) \Phi(r) = 0, \quad (2.2)$$

где $\Phi(r) = \Phi(x, y, z)$ – волновая функция описывающая электрон, а $\int \Phi \cdot \Phi^* dv$ – вероятность нахождения электрона в элементарном объеме dv . $U(r)$ – энергия электронного потенциала.

При взаимодействии электрона с атомом или молекулой, обладающей электростатическим потенциалом $\varphi(r)$, электрон приобретает потенциальную энергию $U(r) = e\varphi(r)$ и упруго рассеивается в виде волновой функции

$$\Phi = \Phi_0 \frac{1}{r} e^{2\pi i k \cdot r} f_e(u) e^{i\delta}, \quad (2.3)$$

где $u = 4\pi/\lambda \sin\theta$, $f_e(u)$ – амплитуда атомного рассеяния и δ – фазовый сдвиг, являющийся следствием рассеяния.

На большом расстоянии от атома рассеяния решение уравнения (2.2.) будет представлять суперпозицию исходной плоской волны и рассеянной сферической волны

$$\Phi = \Phi_0 [e^{2\pi i k_0 \cdot r} + i \frac{f(u)}{r} e^{2\pi i k \cdot r}] \quad (2.4)$$

Амплитуда атомного рассеяния для электронов имеет вид

$$f(u) = |f_e(u)| e^{i\delta} \quad (2.5)$$

$$f_e(u) = -\frac{2\pi m}{h^2} \int 4\pi r^2 \varphi(r) \frac{\sin(ur)}{r} dr \quad (2.6)$$

Таким образом, зная $\varphi(r)$ можно найти $f_e(u)$ для любого u , то есть, зная строение объекта, можно рассчитать дифракционную картину. Амплитуда рассеяния является «образом» объекта $\varphi(r)$ в обратном пространстве. Тогда

$$\varphi(r) = -\frac{m}{\pi h^2} \int f(u) u^2 \frac{\sin(ur)}{r} dr \quad (2.7)$$

Это позволяет решить обратную задачу: по дифракционной картине возможно воссоздать картину рассеивающего объекта, что и является основной задачей структурного анализа.

Аналогичное выражение для амплитуды атомного рассеяния применительно к рентгеновским лучам, которые рассеиваются на электронной

плотности электронной оболочки атома $\rho_-(r)$ можно записать следующим образом

$$f_x = \int 4\pi m r^2 \rho_-(r) \frac{\sin(ur)}{ur} dr \quad (2.8)$$

Подробное описание проведения электронографического и рентгеновского структурного анализа описаны в работах [17, 18, 160- 164].

В настоящей работе проведение фазового анализа большого объема образцов (вплоть до нескольких мм), выявление наличия текстуры в композитах, а также наиболее вероятных кристаллических проекций создающих межфазные контакты осуществлялись на рентгеновских дифрактометрах ДРОН-2 и ДРОН-3М (Cu K $_{\alpha}$ - излучение, фильтрованное никелем).

Проведение локального фазового анализа, наличия текстуры на макро и наноуровне было осуществлено в электронографе ЭМР-102.

Такой подход позволил получить данные о текстуре пленок дезинтегрированной ЦГХ, композитов на основе дезинтегрированной ЦГХ и нанокристаллов ГАП, а также провести сравнение с данными о текстуре исходной пленки ЦГХ.

2.2.2. Методы электронной микроскопии

Сканирующая электронная микроскопия

Морфология поверхности высушенных пленок ЦГХ, а также композитов ЦГХ/нано-Se, ЦГХ/нано-ГАП были исследованы методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборах FEI Quanta 200 3D, FEI Scios, FEI Helios 600 DualBeamTM в режимах вторичных и обратно- рассеянных электронов.

Поскольку в данной работе исследуемым материалом является полимер целлюлоза GX, а также композиты на его основе, это приводит к необходимости использования методик низковольтной СЭМ [26, 30, 165, 166], а также поиску специальных режимов применительно непосредственно для данного полимерного материала.

Взаимодействие электронного пучка с образцом в сканирующем электронном микроскопе происходит в объеме образца, по форме напоминающему «каплю» (Рис.2.3). Размер и форма такой «капли» зависят как от состава образца, так и от энергии падающего пучка. При взаимодействии электронного пучка энергии E_0 с образцом с его поверхности начинают выходить электроны различной природы: вторичные электроны (с энергией $\leq 50\text{эВ}$), обратно-рассеянные (отраженные) электроны (с энергией от 50эВ до энергии E_0) и др.

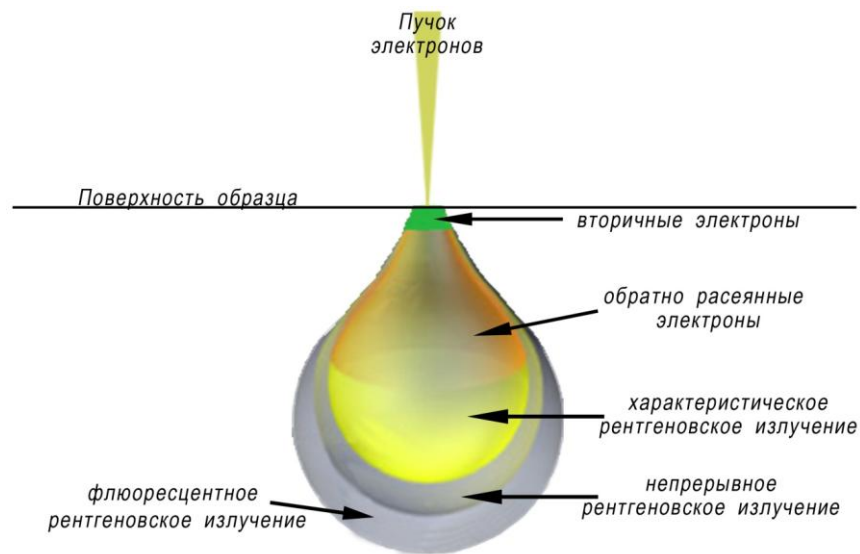


Рис.2.3.Схематичное изображение области генерации в объеме образца при взаимодействии с электронным пучком в сканирующем электронном микроскопе.

Если δ – количество (неупруго рассеянных) вторичных электронов, а η – количество (упруго рассеянных) обратно-рассеянных электронов, эмитированных первичным электроном, тогда по первому закону Киргоффа:

$$I_B = \delta I_B + \eta I_B + I_{SC}, \quad (2.9)$$

где I_B – ток пучка, а I_{SC} – ток от земли к образцу или наоборот. Если образец является диэлектриком, то I_{SC} равен нулю и тогда дисбаланс заряда на поверхности можно представить в виде

$$I_B [1 - (\delta + \eta)] \quad (2.10)$$

Вообще говоря, суммарное количество вышедших электронов с поверхности образца $(\delta + \eta)$ зависит от энергии падающего пучка и для полимеров,

такая зависимость является обратно пропорциональной. При достаточно большой энергии пучка значение $(\delta+\eta) < 1$, что приведет к скоплению отрицательного заряда на поверхности. При некоторой энергии $E_0 = E_2$, $(\delta+\eta) = 1$ и образец будет находиться в условии динамического баланса заряда. А при $E_0 < E_2$ на поверхности будет скапливаться положительный заряд.

Основные методы экспериментального определения энергии E_2 сводятся к двум способам:

1-Метод получения изображения состоит в последовательном выборе ускоряющего напряжения и получении СЭМ изображения образца при низком увеличении (x20-x100), затем сканирование поверхности в течение нескольких секунд при большем увеличении (x500-x2000) и получение СЭМ изображения при исходном увеличении.

Если на заключительном изображении центральная область, сканированная при большем увеличении, имеет светлый контраст, то область заряжена отрицательно и энергия пучка больше искомой энергии E_2 и, наоборот, если область имеет темный контраст, то область заряжена положительно и энергия пучка меньше E_2 (Рис.2.4.а).

2- Метод определения емкости заключается в том, что электронный пучок выступает в роли виртуального катода, а образец в качестве диэлектрика в конденсаторе с параллельной пластиной. При $t=0$ пучок с энергией E_0 сканирует область определенного размера, а электростатический потенциал на образце фиксируется с помощью электрометра (Рис.2.4.б).

Измеренный ток образца I_B , в этом случае зависимость потенциала от времени можно выразить формулой:

$$V(t) = \frac{1}{C} \int_0^t I_B dt, \quad (2.11)$$

где C - эффективная емкость области на образце. Если $E_0 > E_2$ и $(\delta+\eta) < 1$, то ток образца и следовательно $V(t)$ отрицательны, иначе при $E_0 < E_2$ $V(t)$ имеет положительный знак.

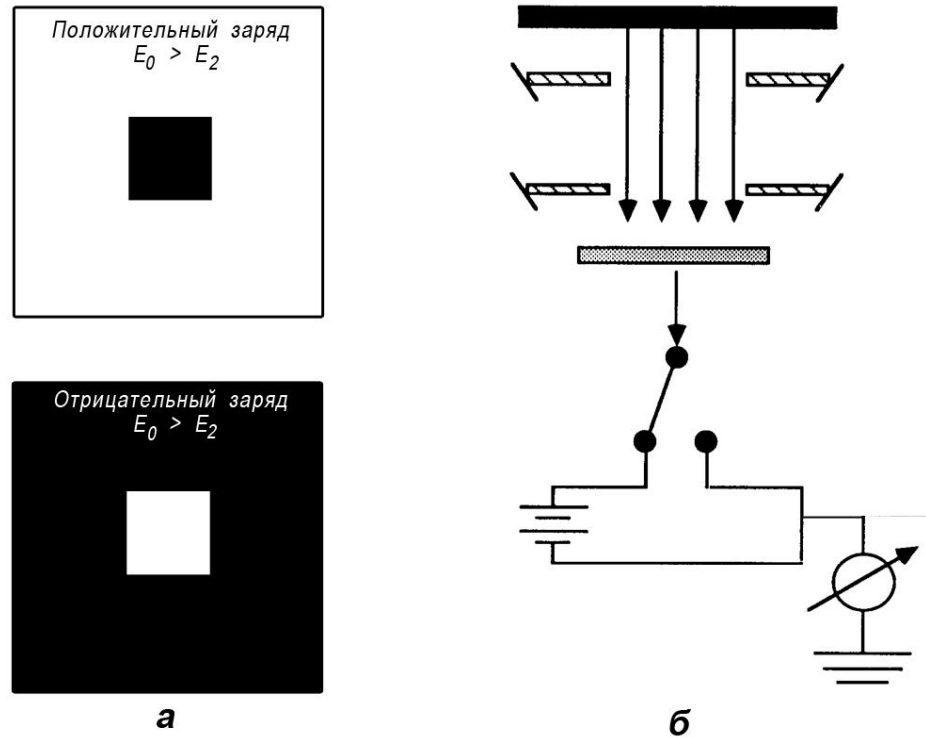


Рис.2.4. Определение энергии E_2 первым способом – (а), экспериментальная установка для измерения E_2 с помощью емкостного метода – (б) [26].

Для большинства полимеров значение энергии E_2 лежит в области низких ускоряющих напряжений < 2 кВ [26]. Такие низкие энергии первичного пучка уменьшают энергию взаимодействия электронного пучка с материалом и минимизируют радиационные повреждения. Однако при этом существенно возрастают aberrации электромагнитных линз, что приводит к увеличению диаметра электронного пучка на образце и, следовательно, ухудшению разрешения. В низковольтной СЭМ в последнее время активно отрабатываются методики съемки с улучшенным пространственным разрешением и контрастом.

Учитывая aberrации системы электронных линз, диаметр электронного пучка можно представить в виде:

$$d_p = ((i/B + (1.22\lambda)^2) \cdot 1/\alpha^2 + (0.5C_s)^2 \cdot \alpha^6 + (C_c \cdot \Delta E/E_{acc})^2 \cdot \alpha^2)^{1/2} \quad (2.12)$$

В низковольтной СЭМ существенный вклад в диаметр пучка электронов вносит хроматическая aberrация, тогда:

$$d_p \sim C_c \alpha (\Delta E/E_{acc}) \quad (2.13)$$

Для уменьшения диаметра пучка необходимо уменьшить вклад коэффициента хроматической абберации C_c и величину $\Delta E/E_{acc}$ - отношение величины разброса по энергиям к величине энергии первичного пучка. Это удастся осуществить путем усовершенствования объективной линзы микроскопа (магнитная линза, электростатическая линза), а также с помощью метода «тормозящего излучения» («катодная линза»).

Принцип последнего подхода заключается в прикладывании отрицательного напряжения на образец, вызывая торможение падающих на образец электронов. Это позволяет использовать большие энергии исходных электронов, выходящих из пушки, при этом энергия взаимодействия электронов с поверхностью образца остается низкой.

$$LE=HV-SB, \quad (2.14)$$

где HV- ускоряющее напряжение (со знаком -), SB- напряжение, подаваемое на образец (со знаком -), LE- энергия падающего пучка электронов на образец (в электронвольтах) [165].

Геометрическую конфигурацию полученной системы можно описать с помощью «иммерсионного соотношения» - k, которое может быть рассчитано по формуле:

$$k= -eHV(HV-SB)=-eHV/LE, \quad (2.15)$$

Чем больше коэффициент k, тем тем меньше вклад сферической и хроматической аббераций, при этом коэффициент C_c практически прямо пропорционален коэффициенту k. Это приводит к компенсации уширения диаметра пучка при низких ускоряющих напряжениях, когда режим «катодной линзы» не используется (Рис.2.5.а,б).

Пример зависимости разрешения (диаметра пучка, нм) от энергии взаимодействия пучка с образцом с использованием «катодной линзы» и без приведен на Рис.2.5.в. Можно заметить, что разрешение при низких ускоряющих напряжениях резко возрастает в случае использования «катодной линзы», особенно для энергий $E_0 < 2$ кэВ.

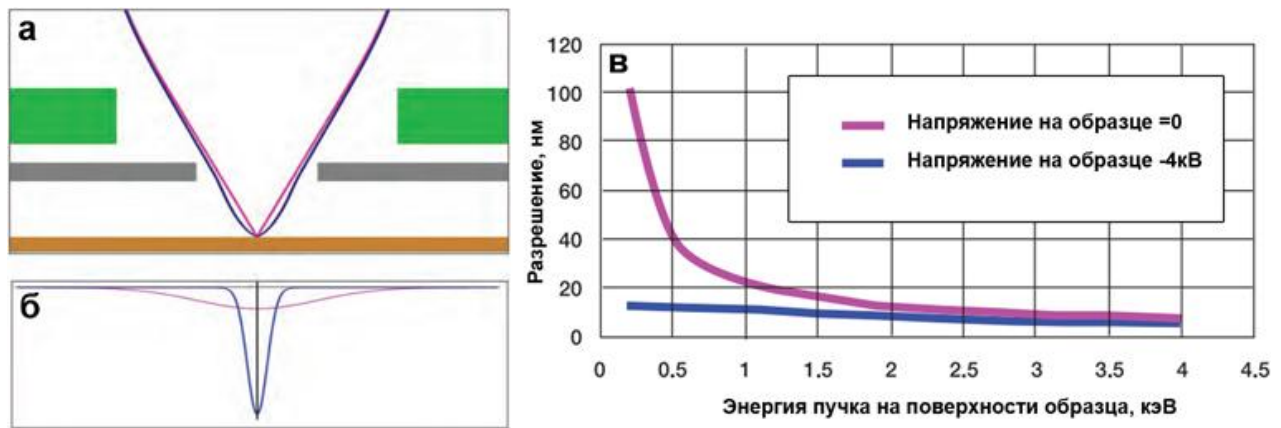


Рис.2.5. Траектории электронного пучка в типичной конфигурации с выключенной катодной линзой (бордовый) и включенной (голубой) – (а), соответствующие профили электронных пучков – (б). Зависимость разрешающей способности микроскопа с термоэмиссионным катодом и обычной магнитной линзой с использованием режима «катодной линзы» и без – (в) [165].

Кроме того можно изменять природу регистрируемого сигнала от топографического контраста (от обратно-рассеянных электронов близких к первичному пучку) до композиционного контраста (от обратно-рассеянных электронов, составляющих больший угол с первичным пучком), путем изменения значения k (иммерсионное отношение) или используя кольцевой детектор.

Анализ наноструктурных особенностей поверхности диэлектрических пленок на основе ЦГХ был проведен с использованием вышеописанных методик низковольтной сканирующей электронной микроскопии на микроскопах Scios FEI, Quanta 200 3D FEI.

Просвечивающая электронная микроскопия

Изображения срезов композитов ЦГХ/нано-Se, ЦГХ/нано-Se-Ag, наночастиц ГАП на волокнах целлюлозы и темнопольных изображений композитов ЦГХ/ГАП были получены с помощью просвечивающих электронных микроскопов FEI Tecnai G², FEI Tecnai Osiris при ускоряющих напряжениях 200 - 300 кВ. Визуализация отдельных наночастиц Se, а также отдельных наночастиц ГАП с атомным разрешением проводились в электронных микроскопах FEI Osiris,

FEI Titan 80-300 с probe-корректором при ускоряющем напряжении 80 кВ. Использование низкого ускоряющего напряжения позволило получить изображения наночастиц вплоть до атомного уровня без радиационных повреждений.

Фазовый состав наночастиц в композитах был исследован с помощью микро и нано электронной дифракции.

Элементный состав композитов определялся методом энергодисперсионного рентгеновского микроанализа. Получение EDX-спектров как от скопления, так и от отдельных наночастиц, количественное описание спектров осуществлялись в программе TIA (Tecnaï Imaging & Analysis) ES Vision 4.1.

Анализ данных полученных с помощью ПЭМ

Количественный анализ электронограмм (измерение расстояний и углов, калибровка) и их интерпретация, обработка ВРЭМ изображений: фильтрация шума на изображениях, построение преобразований Фурье были проведены в программе DigitalMicrograph 3.8.2.

Моделирование картин электронной дифракции, наложение расчетных электронограмм на экспериментальные, моделирование ВРЭМ изображений в зависимости от толщины, дефокуса и наклона образца были проведены в программе JEMS (Java Electron Microscopy System) [22]. Толщина кристаллов в композитах была определена с помощью моделирования ВРЭМ изображений, используя традиционное приближение блоховских волн (алгоритм Бете).

Определение толщины кристалла (метод блоховских волн)

В работах Fujimoto (1978) и Kambe (1982) [167, 168] отмечается, что для идеального кристалла ВРЭМ изображение может быть описано в терминах блоховских волн. Ключевой момент состоит в том что, несмотря на большое количество образующихся дифрагированных волн, всего лишь несколько блоховских волн приводят к появлению ВРЭМ изображения. При наличие трех

таких волны i, j, k и предположении, что данные волны будут находиться в фазе на глубине (толщине) $z=D$

$$e^{ik_z^{(i)}z} = e^{ik_z^{(j)}D} \quad (2.16)$$

Используя данное выражение для решения уравнения Шредингера (2.2), а именно

$$\Phi(r) = \sum_i C^{(i)} \phi^{(i)}(x, y) e^{ik_z^{(i)}z}, \quad (2.17)$$

А также условие нормирования

$$\sum_i C^{(i)} \phi^{(i)}(x, y) = 1 \quad (2.18)$$

Φ на глубине $z=D$ можно выразить через три блоховские волны (i, j, k)

$$\Phi(x, y, D) = [C^{(i)} \phi^{(i)} + C^{(j)} \phi^{(j)}] e^{ik_z^{(i)}D} + C^{(k)} \phi^{(k)} e^{ik_z^{(k)}D} \quad (2.19)$$

Перепишем это выражение, извлекая фазовый коэффициент $e^{ik_z^{(i)}z} (= e^{ik_z^{(i)}D})$

$$\Phi(x, y, D) = [1 - C^{(k)} \phi^{(k)}] e^{ik_z^{(i)}D} + C^{(k)} \phi^{(k)} e^{i(k_z^{(k)} - k_z^{(i)})D} e^{ik_z^{(k)}D} \quad (2.20)$$

$$\Phi(x, y, D) = e^{ik_z^{(i)}D} [1 + \beta_{ik}(D) C^{(k)} \phi^{(k)}], \quad (2.21)$$

где

$$\beta_{ik}(D) = e^{i(k_z^{(k)} - k_z^{(i)})D} - 1 \quad (2.22)$$

Таким образом, если любые две блоховские волны (i и j в данном случае) находятся в фазе, тогда амплитуда волны определяется третьей волной Блоха. Если третья блоховская волна также находится в фазе, то в выражении (2.16) i, j, k – равны и мы можем аппроксимировать $\beta_{ik}(D)$

$$\beta_{ik}(D) = i[(k_z^{(k)} - k_z^{(i)})D + 2\pi n] = i\gamma_{ik}(D) \quad (2.23)$$

В своей работе Камбе [168], используя данные выкладки, а также проекцию потенциала (Рис.2.6.а), рассчитал блоховские волновые амплитуды (Рис.2.6.б) и два идеальных изображения блоховской волны: одно – положительное (Рис.2.в.), другое – отрицательное (Рис.2.6.г).

При анализе различных изображений в зависимости от толщины, несколько изображений, соответствующих одной блоховской волне, могут быть рассчитаны

как показано на Рис.2.6. В случае других значений толщин изображения являются комбинацией блоховских волн.

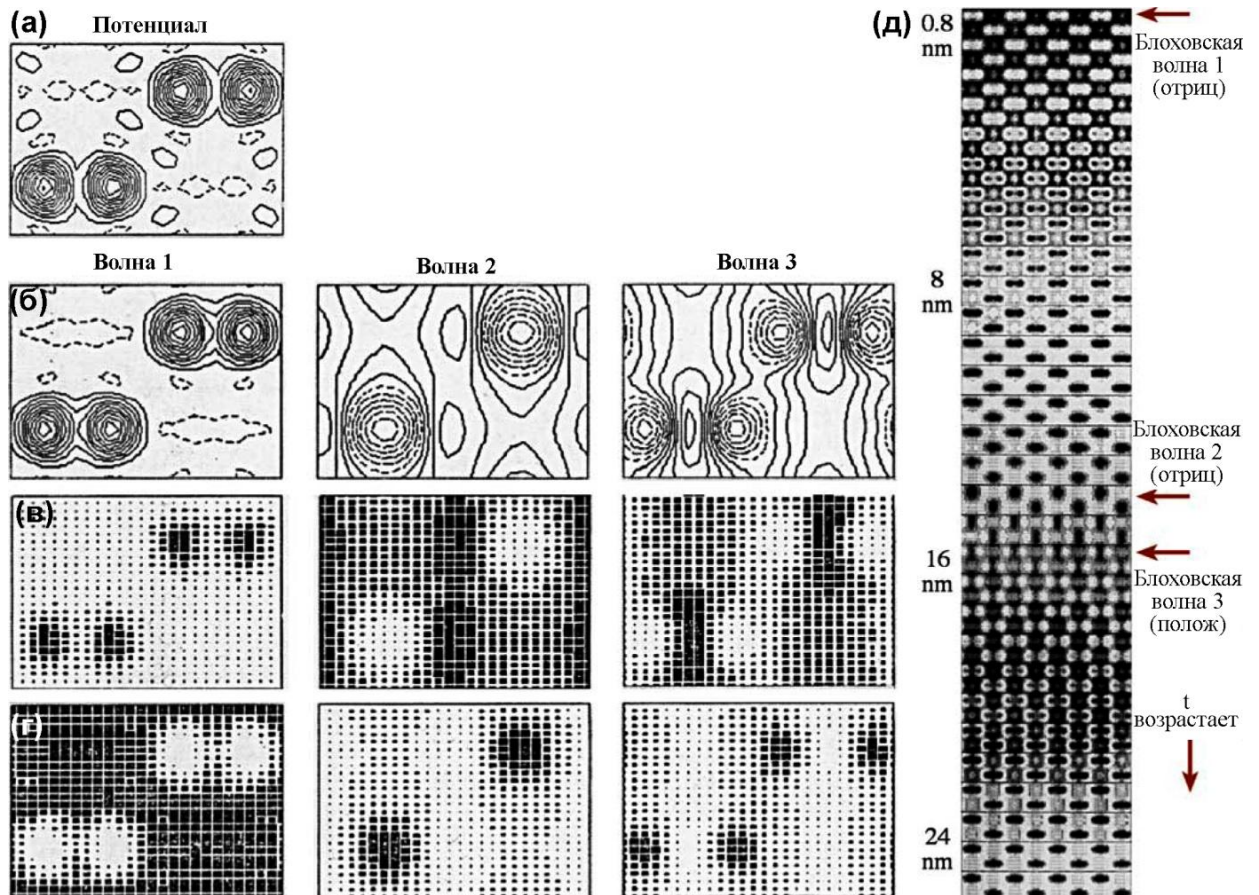


Рис.2.6. (а)- проекция потенциала структуры Ge. Для трех блоховских волн (1,2 и 3) и электронов с энергией 100кэВ: амплитуды (б), идеальные положительные изображения (в), идеальные отрицательные образы (г). Расчетные изображения решетки в зависимости от толщины t (д).

2.2.3. Исследование физико-химических свойств композитов ЦГХ/ГАП

Поскольку композитные материалы ЦГХ/ГАП предполагается использовать в качестве наполнителя костных дефектов или заместителя костной ткани, были измерены основные физико-химические свойства композитов: плотность, пористость, объем пор, площадь удельной поверхности, модуль Юнга. Проведен сравнительный анализ полученных свойств композитов с характеристиками естественной костной ткани.

Метод Браунауэра-Эммета-Тейлора (БЭТ) и Баррета-Джойнера-Халендера (БДХ)

Для определения удельной свободной поверхности образцов, а также для характеристики их пористой структуры использовали метод тепловой десорбции азота на приборе Micrometrics ASAP 2010M (США). Обработка результатов осуществлялась по модели БЭТ при условии проведения анализа – температура - 196⁰С и относительном давлении паров $P/P_0=0.2$. Размеры пор в текстуре образцов (с диаметром ≤ 100 нм) определяли по модели БДХ. Плотность и пористость полученных образцов были определены расчетным методом по данным о массе и объеме композитных образцов.

Механические испытания

Для проведения механических испытаний из полученных пленок вырубали образцы в виде двухсторонних лопаток с размерами рабочей части 10x3 мм. Испытания проводили на универсальном испытательном приборе INSTRON 5965 в режиме одноосного растяжения с постоянной скоростью (1 мм/мин). По результатам испытаний были определены основные механические характеристики (модуль Юнга, разрывная прочность) в соответствии с рекомендациями ГОСТ 11262-80.

ГЛАВА 3. МАТРИЦА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ *GLUCONACETOBACTER XYLINUS*: ТЕКСТУРА И ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ

Бактериальная целлюлоза, а также композиты на ее основе, как и большинство биополимерных систем, являются непроводящими материалами и сильно заряжаются под электронным пучком. Кроме того, они очень чувствительны к облучению высокоэнергетическими электронами, что вызывает повреждение материала во время электронно-микроскопических исследований и, как следствие, понижает достоверность данных о структуре, морфологии поверхности и межфазовых областей. Поэтому необходим поиск специальных подходов в постановке эксперимента и анализа данных в электронной микроскопии в исследовании материалов на основе целлюлозы.

3.1. Оптимизация метода низковольтной сканирующей электронной микроскопии в исследовании ЦГХ

При анализе поверхности нано-гель-пленки целлюлозы GX в сканирующем электронном микроскопе, меняя ускоряющее напряжение, можно наблюдать несистематическое появление темных или светлых областей на изображениях, что свидетельствует о существовании заряда на поверхности. При малых увеличениях 1000-5000 эффекты заряда не отражаются на изображении, однако при увеличениях 100000-200000 они становятся видны, что приводит к невозможности получения достоверной информации о морфологии объекта на наноуровне (Рис.3.1). Однако, как было показано [26], можно найти такое значение энергии пучка (E_2), при котором на поверхности будет реализовываться нулевой заряд.

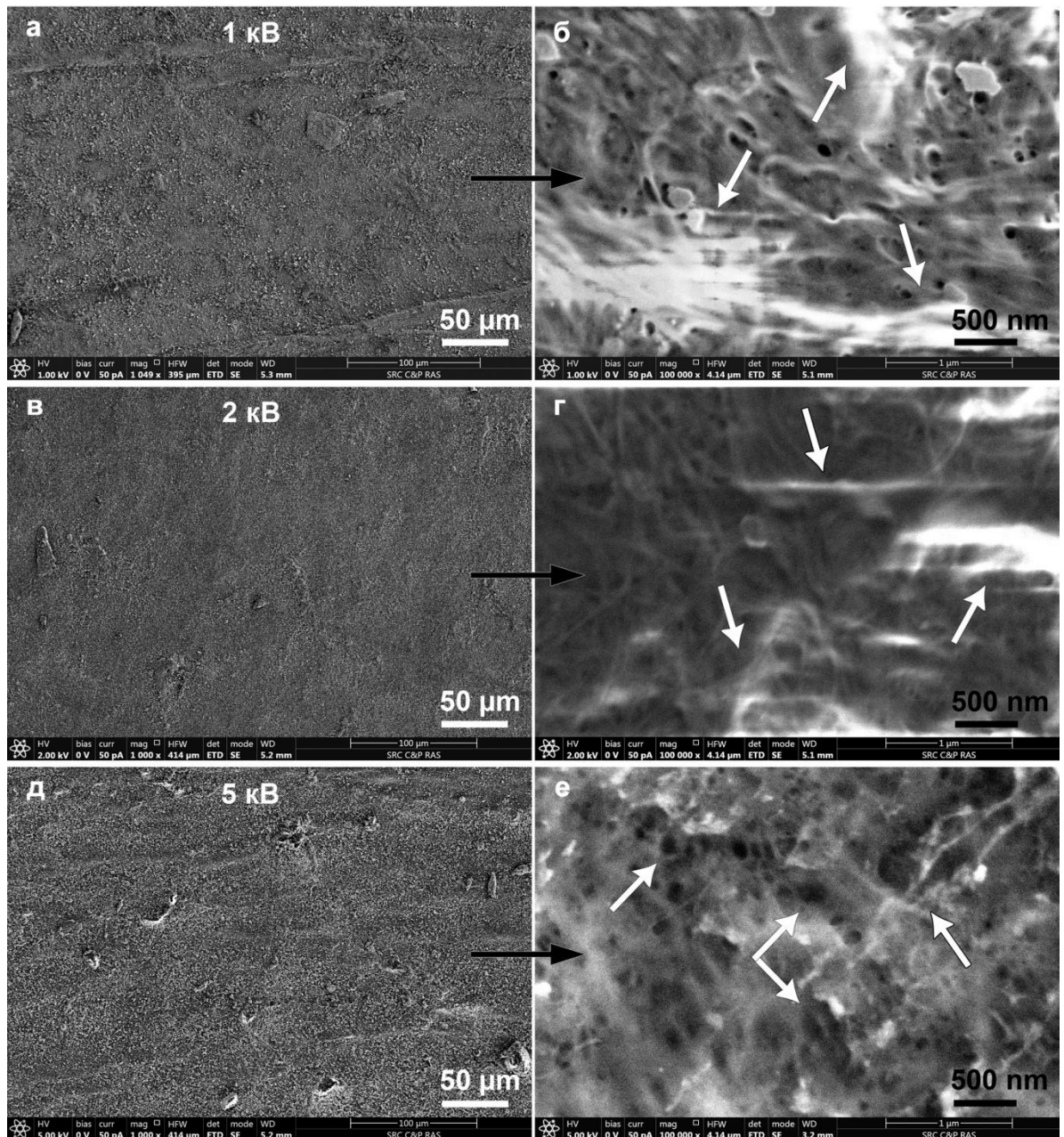


Рис.3.1. СЭМ изображения поверхности нано-гель-пленки ЦГХ при ускоряющих напряжениях 1 кВ (а, б), 2 кВ (в, г), и 5 кВ (д, е), полученные в сканирующем электронном микроскопе FEI Scios в режиме Optiplan. Эффекты заряда (б, г, е) на изображениях отмечены стрелками. Применение ускоряющего напряжения 5 кВ приводит к сильному радиационному повреждению поверхности нано-гель-пленки (е).

Значение такой энергии (E_2) было определено экспериментальным способом. На Рис. 3.2 приведена серия изображений поверхности целлюлозы GX

при 100 кратном увеличении и ускоряющих напряжениях 200 В, 500 В, 1 кВ, 1,5 кВ, 2 кВ, 5 кВ.

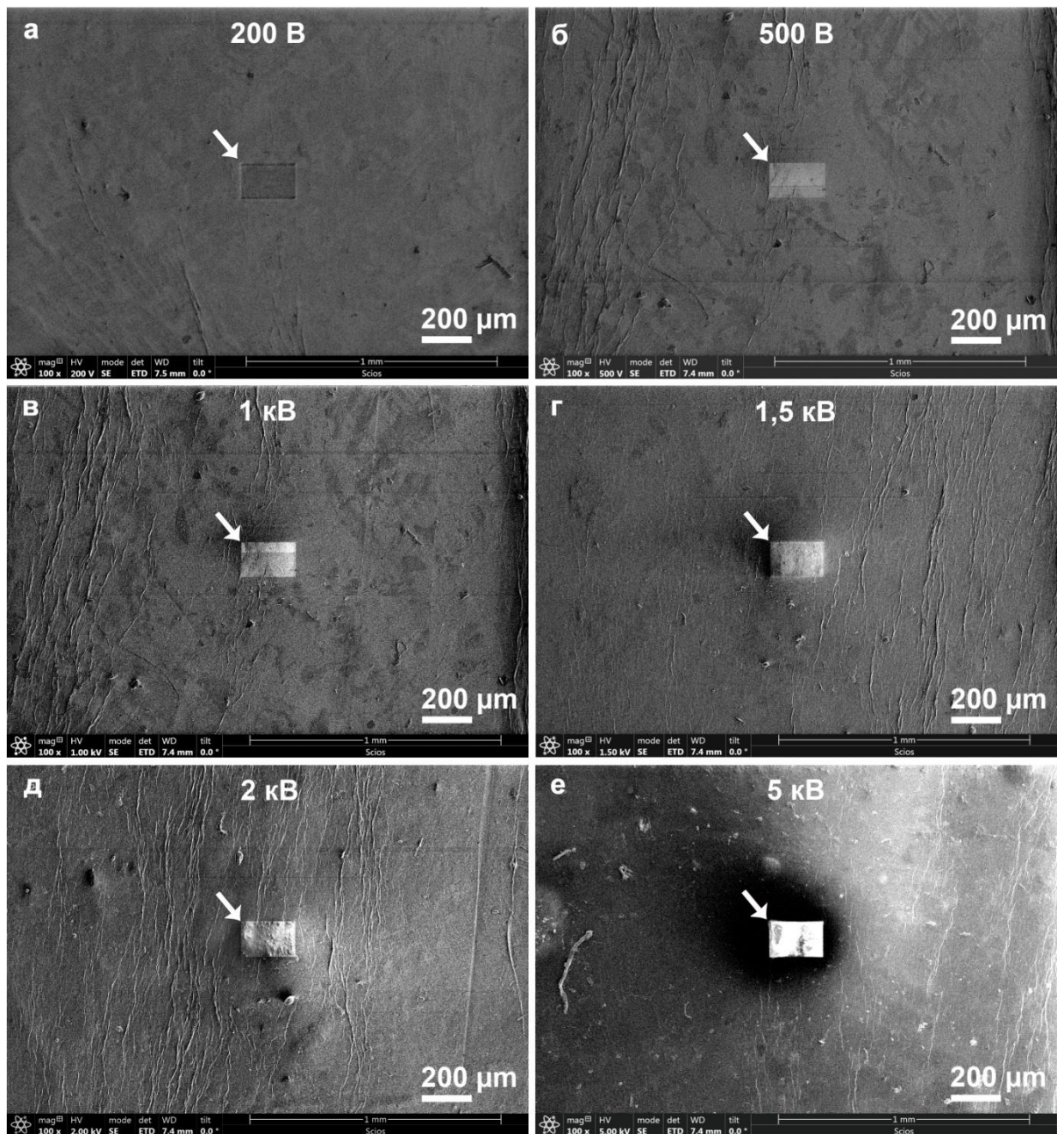


Рис.3.2. Изображения поверхности нано-гель-пленки ЦГХ при разных ускоряющих напряжениях в режиме вторичных электронов после сканирования центральной области (отмеченной стрелкой). При энергии пучка меньше E_2 центральная область имеет темный контраст (а), при энергии пучка больше E_2 центральная область имеет светлый контраст (б, в, г, д, е).

Если область в центре после сканирования при определенном увеличении имеет светлый контраст, то поверхность заряжена отрицательно и энергия пучка больше E_2 , если темный контраст, то поверхность заряжена положительно и энергия пучка меньше E_2 . Видно, что при ускоряющем напряжении 5 кВ (Рис.3.1 е, 3.2 е) происходит сильное взаимодействие электронов с поверхностью ЦГХ, что приводит к ее радиационному повреждению. Значение, при котором достигается баланс заряда, находится в области 200 - 500 В.

Для более точного определения энергии E_2 рассмотрим серию изображений в области 200-500 В с шагом в 50 В (Рис.3.3). Так как мы близки к точке равновесия заряда, то изменим режим сканирования от 1 мкс до 20-30 мкс. Значение энергии, при которой заряд на поверхности близок к нулю, отвечает отсутствию контраста центра относительно остальной области на изображении. Для целлюлозы GX такое значение соответствует $E_2 = 350-400$ эВ.

При исследовании композитных материалов (полимер-полимер, полимер-наночастицы) наряду с топографическим контрастом требуется знание элементного состава, для чего необходим и композиционный контраст. Для решения данной задачи используют детектирование обратно рассеянных электронов. Низкие ускоряющие напряжения не дают возможности получать изображения с высоким разрешением (Рис.3.4.а). Для улучшения пространственного разрешения применяют метод тормозящего излучения, при котором к образцу прикладывается дополнительное отрицательное напряжение, создающее электростатическое поле и действующее как «катодная линза».

Учитывая, что для полимерной системы целлюлоза GX наиболее предпочтительно использовать энергию тормозящего пучка, равную рассчитанной $E_2 \sim 400$ эВ, формула (2.14) примет вид:

$$HV - SB = 400,$$

где напряжение, подаваемое на образец (SB) лежит в пределах от 0 до 4000 В. Тогда исходная энергия пучка (HV) может принимать значения от 400 эВ до 4400 эВ, а параметр иммерсии k , согласно формуле 2.15, равный $HV/400$, и лежит в пределах от 1 до 11.

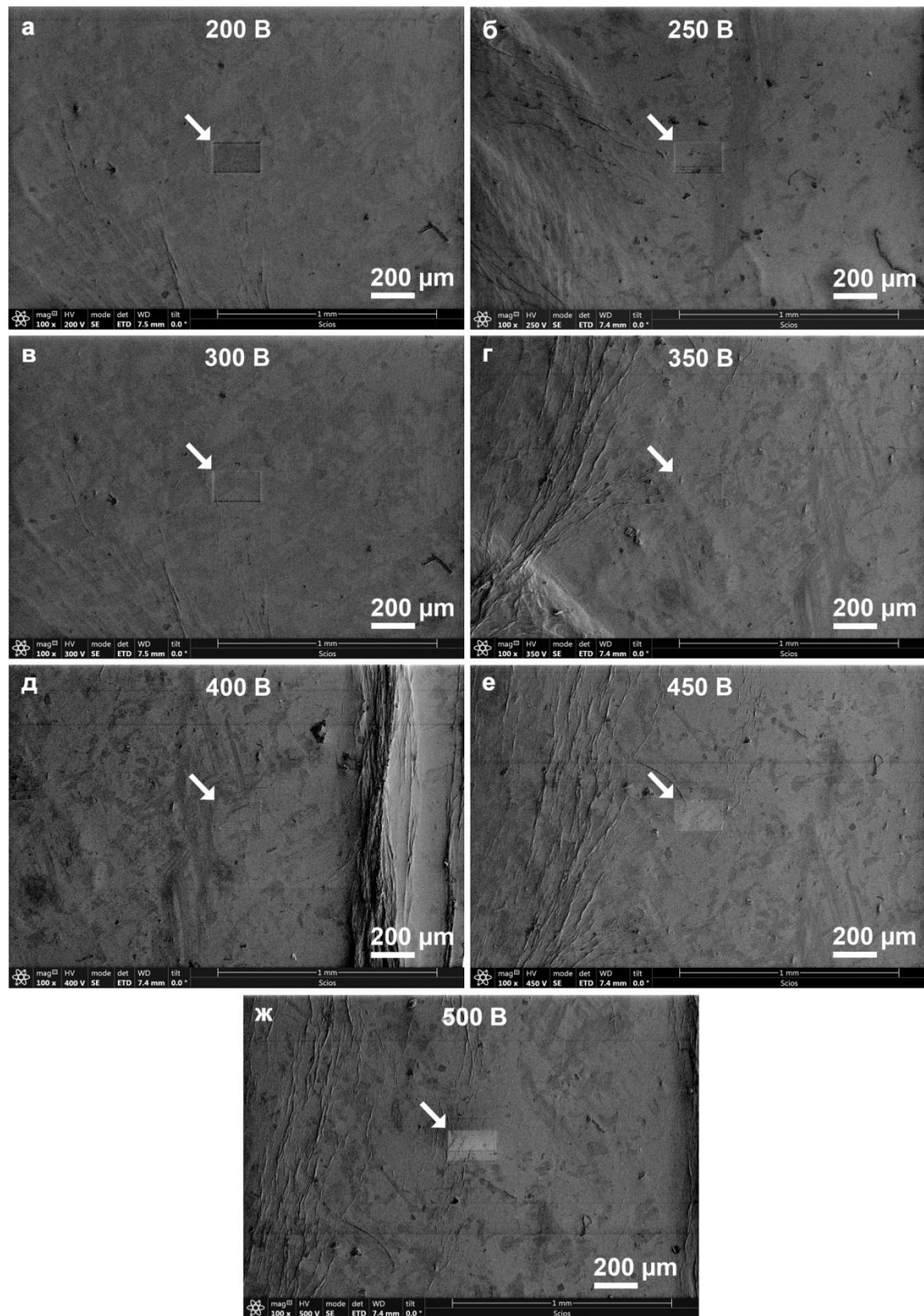


Рис.3.3. Изображения поверхности нано-гель-пленки ЦГХ при ускоряющих напряжениях 200-500 В с шагом в 50 В в режиме вторичных электронов после сканирования центральной области (отмеченной стрелкой). При энергии пучка меньше E_2 центральная область имеет темный контраст (а, б, в), при энергии пучка больше E_2 центральная область имеет светлый контраст (е, ж), при энергии пучка равной E_2 контраст между центральной областью и остальной областью изображения отсутствует (г, д).

На Рис. 3.4. представлена серия изображений, полученных при разных значениях коэффициента иммерсии k . Видно, что при увеличении коэффициента иммерсии увеличивается контраст и разрешение на изображении, что особенно важно для полимерных систем. Стоит отметить, что при энергии взаимодействия электронов с поверхностью целлюлозы GX, равной 400 эВ, и коэффициенте $k=11$ энергия первичных электронов равна 4400 эВ. Такое большое значение энергии и обеспечивает улучшенное пространственное разрешение (Рис.3.4.г).

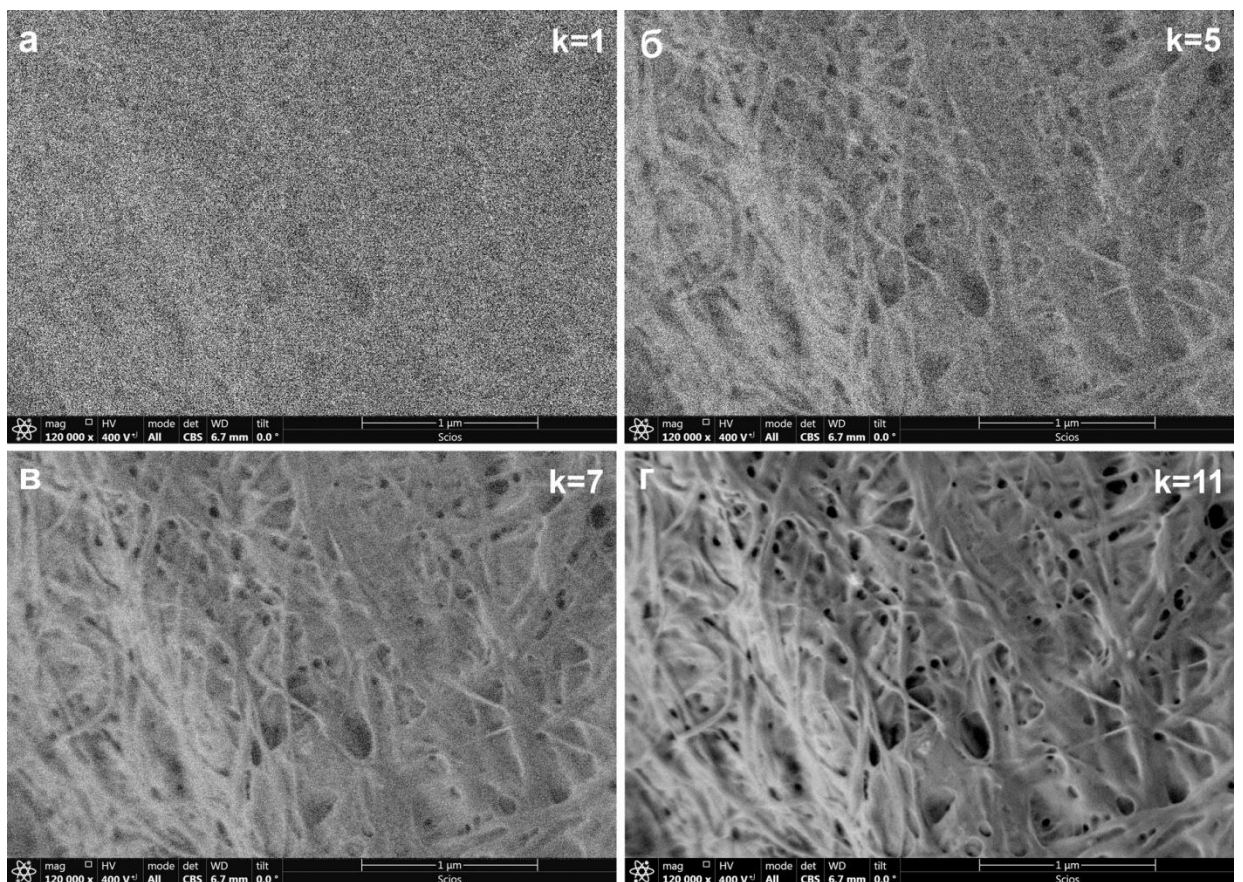


Рис.3.4. СЭМ изображения поверхности нано-гель- пленки целлюлозы GX в обратно- рассеянных электронах при разных значениях коэффициента иммерсии k равным: а- 1, б – 5, в – 7, г – 11.

На Рис.3.5 представлены изображения поверхности нано-гель- пленки целлюлозы GX, а также композитов ЦGX-нано-Ag, ЦGX-нано-ГАП, полученные при энергии тормозящего излучения 400 эВ для нано-гель-пленки ЦGX (а, б), 500 эВ для нано-гель-пленки ЦGX с наночастицами Se (в, г) и 1 кэВ для композита,

состоящего из нанокристаллов ГАП и волокон ЦГХ (д, е) в режиме вторичных электронов (топографический контраст) и в режиме обратно рассеянных электронов, при максимально возможном коэффициенте иммерсии $k=11$ (композиционный контраст).

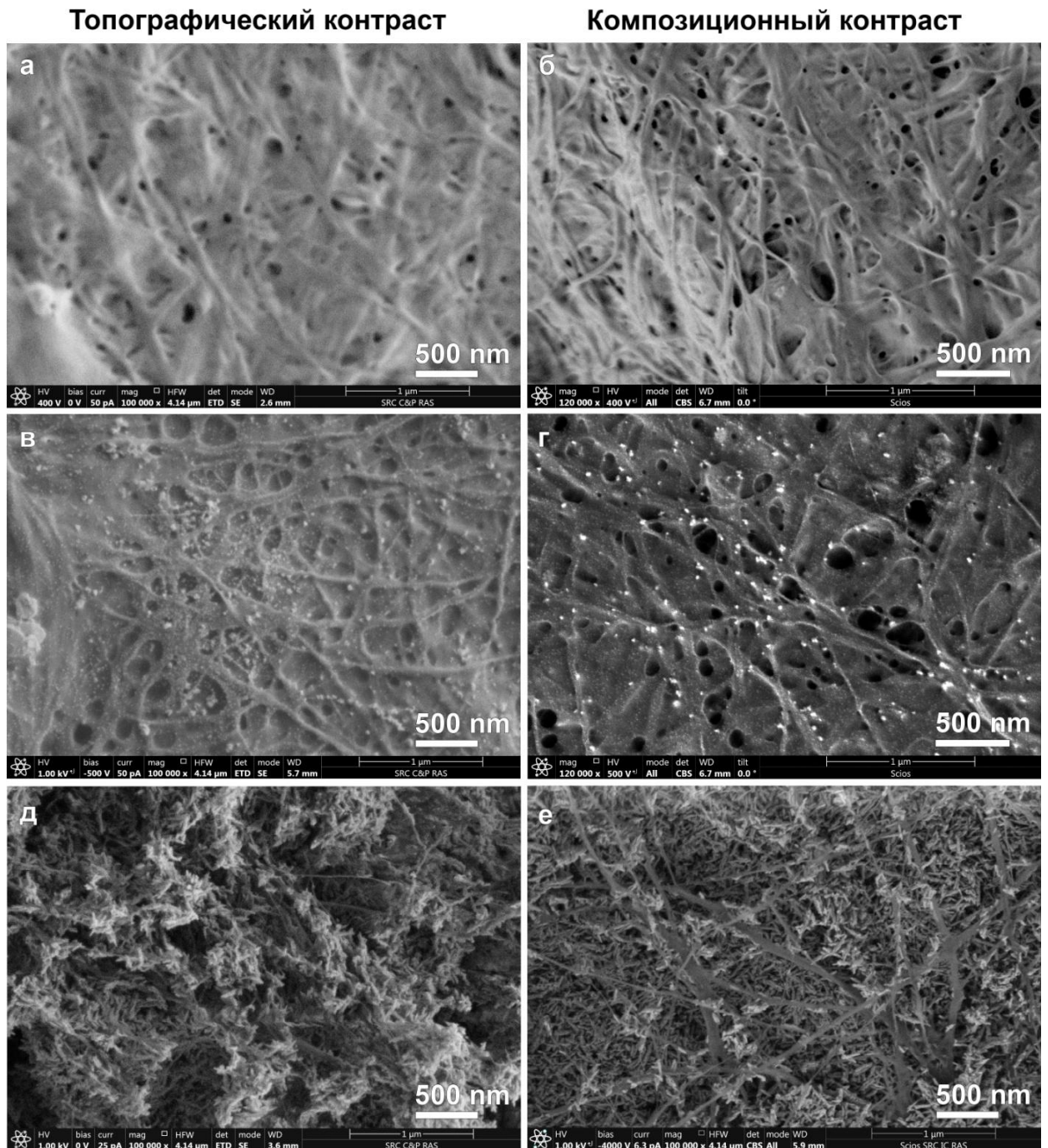


Рис. 3.5. Изображения верхней поверхности целлюлозы GX (а, б) и композитов на ее основе: ЦГХ/нано Se⁰ (в, г), ЦГХ/нано ГАП (д, е), полученные во вторичных (топографический контраст) и обратно рассеянных электронах (композиционный контраст).

Важно отметить, что в зависимости от соотношения компонентов в композите энергия E_2 , при которой реализуется баланс заряда на поверхности, может изменять свое значение: с увеличением числа наночастиц в полимере энергия E_2 будет приближаться к равновесному значению для данных наночастиц.

Для оценки глубины выхода обратно рассеянных электронов из nano-гель-пленки ЦГХ было проведено моделирование взаимодействия электронного пучка с веществом в рамках метода Монте-Карло, позволяющего описать траектории движения электронов в образце. На Рис.3.6. представлены расчетные гистограммы распределения глубины проникновения электронов в nano-гель-пленке ЦГХ в зависимости от ускоряющего напряжения.

Глубина проникновения электронов зависит от характеристик образца и возрастает при увеличении энергии первичных электронов, падающих на образец. Для ЦГХ глубина проникновения варьируется от 1-2 нм для 100-200 эВ до ~ 100 нм для 2 кэВ.

Согласно формуле Канава-Окаюта [169], глубина проникновения (глубина свободного пробега) электронов (R) в nano-гель-пленке ЦГХ при энергии первичных электронов $E=0.4$ кэВ будет равна:

$$R_{\text{ЦГХ}} = 27.6 \frac{M}{\rho Z^{8/9}} E^{5/3} = 27.6 \frac{162}{1.54 \cdot 52.69} * 0.216 = 12 \text{ (нм)},$$

где E – энергия первичных электронов; кэВ, M - молярная масса, г/моль; ρ - плотность вещества г/см³; R - длина пробега, нм.

Из Рис. 3.6 видно, что максимальная длина свободного пробега значительно меньше максимальной глубины выхода обраторассеянных электронов. Действительно, часть электронов при неупругих столкновениях теряет энергию, и вероятность выхода таких электронов резко уменьшается с увеличением глубины. На Рис.3.7 представлены сечения областей поглощенной энергии в гель-пленке ЦГХ с указанием контурных энергетических линий, показывающих процент энергии за пределами данной линии. Так, например, внутри области от синего до желтого контура 50% энергии электронов будет поглощено в образце.

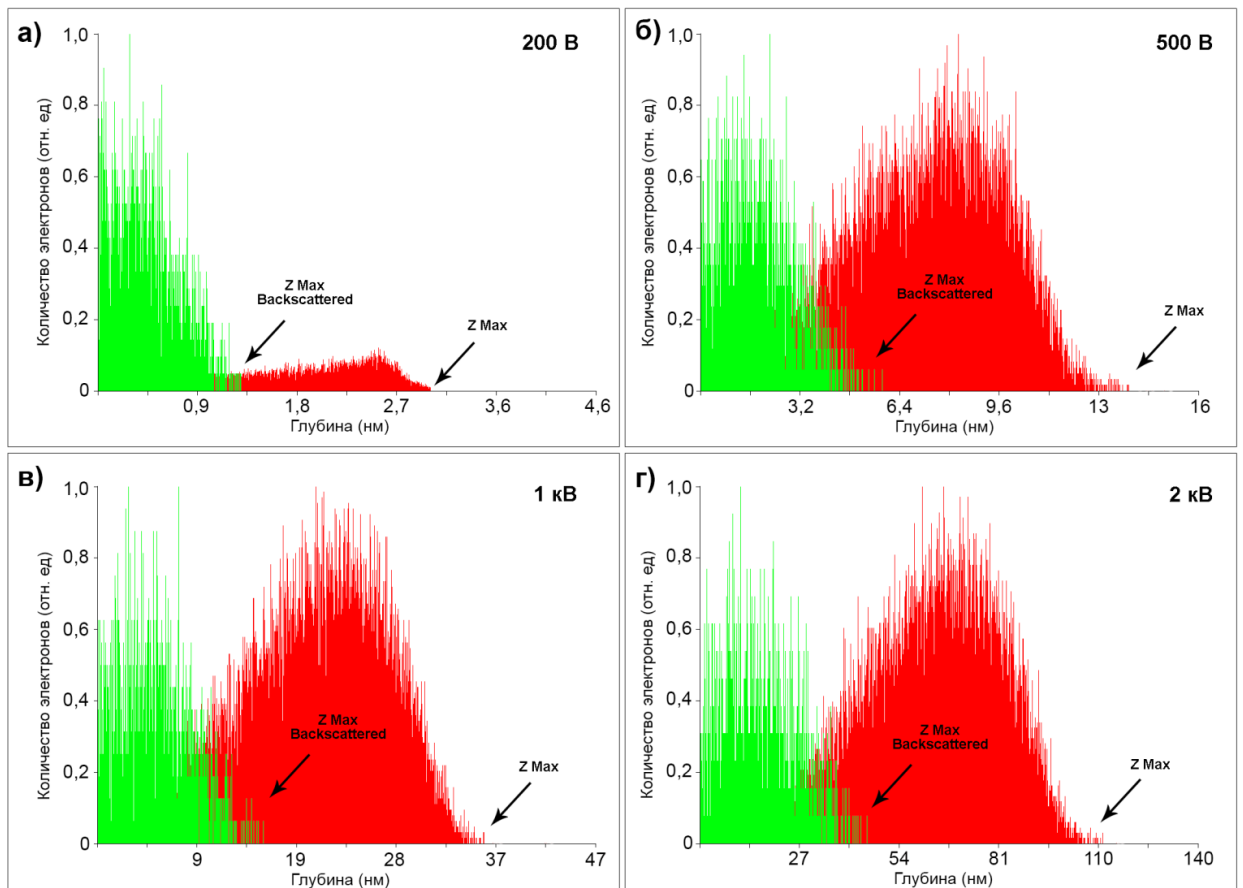


Рис. 3.6. Гистограммы распределения глубины проникновения электронов в нано-гель-пленке ЦГХ в зависимости от ускоряющего напряжения с указанием максимальной глубины проникновения (Z_{Max}), а также соответствующие гистограммы распределения глубины проникновения электронов, которые способны покинуть образец, с указанием максимальной глубины выхода обратно рассеянных электронов ($Z_{Max \text{ Backscattered}}$). Расчет производился в программе CASINO для 20 000 электронов, нормально падающих на поверхность.

Отношение максимального значения глубины проникновения электронов к максимальному значению выхода обратно рассеянных электронов с поверхности нано-гель-пленки ЦГХ в среднем составляет $Z_{Max \text{ Backscattered}}/Z_{Max}=0,25$. Таким образом только четвертая часть электронов будет обладать энергией, достаточной для выхода с поверхности пленки ЦГХ.

Итак, для энергии первичных электронов $E= 0,4 \text{ кэВ}$ максимальная глубина выхода обратно рассеянных электронов составляет 4 нм, что соответствует получению информации о структуре нано-гель-пленки ЦГХ с глубины $\leq 4 \text{ нм}$.

Отметим, что глубина выхода истинно вторичных электронов в несколько раз меньше глубины выхода обратно рассеянных и лежит в приповерхностном слое толщиной $\leq 1-2$ нм.

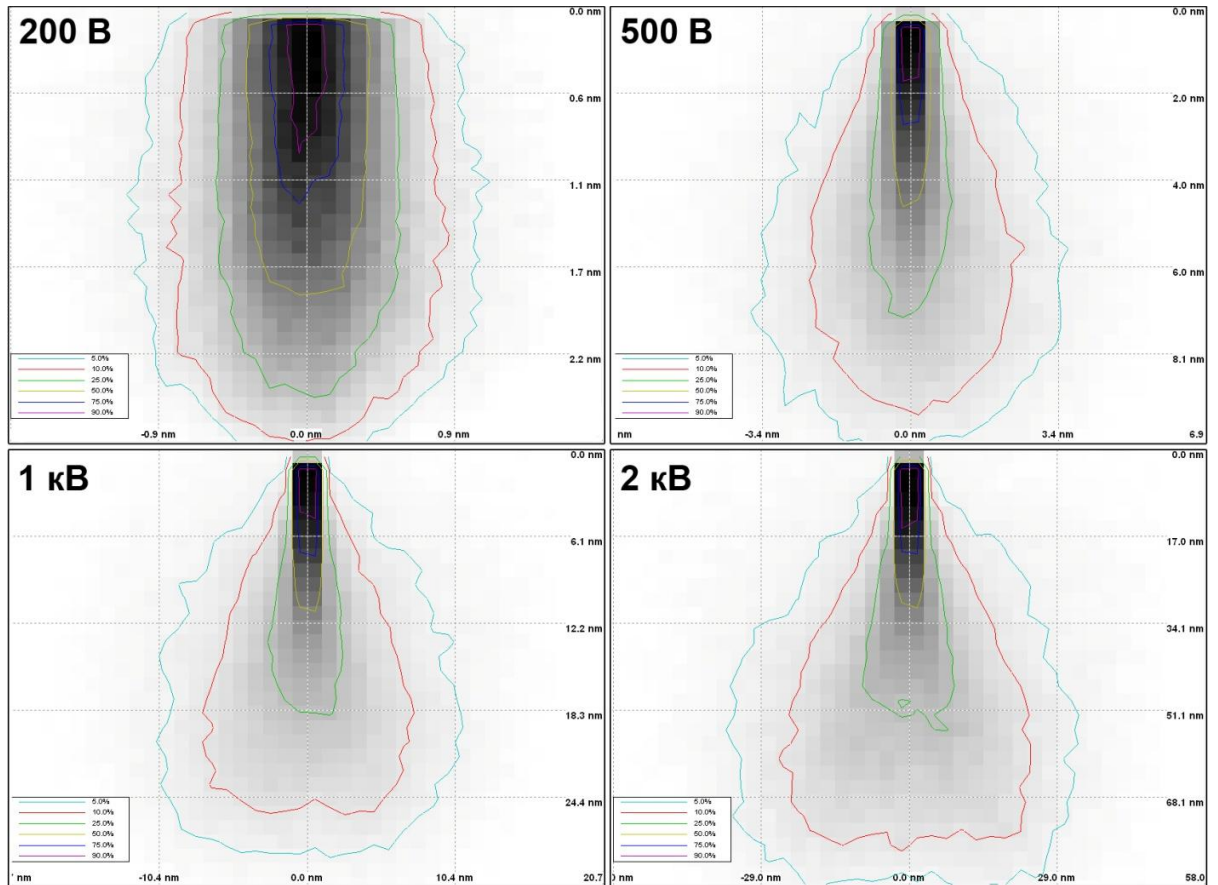


Рис.3.7. Сечения области распределения поглощенной энергии в нано-гель-пленке ЦГХ в зависимости от ускоряющего напряжения. Расчет траектории электронов в ЦГХ производился по методу Монте-Карло в программе CASINO для 20 000 электронов, нормально падающих на поверхность.

3.2. Морфология ЦГХ. Определение размера пор на поверхности высушенных пленок

В качестве основы композитных материалов в работе использовалась как исходная нано-гель-пленка, так и водная суспензия ЦГХ, приготовленная по методике описанной в работе [139], содержащая фрагменты дезинтегрированной нано-гель-пленки ЦГХ. Исследование структуры ЦГХ после дезинтегрирования

было проведено с помощью сканирующей электронной микроскопии и рентгеновской дифрактометрии.

Используя выше изложенный подход к исследованию морфологии поверхности бактериальной целлюлозы, можно определить размер пор на поверхности высушенной исходной нано-гель- пленки ЦГХ. Изображения верхней и нижней поверхности ЦГХ представлены на Рис.3.8.

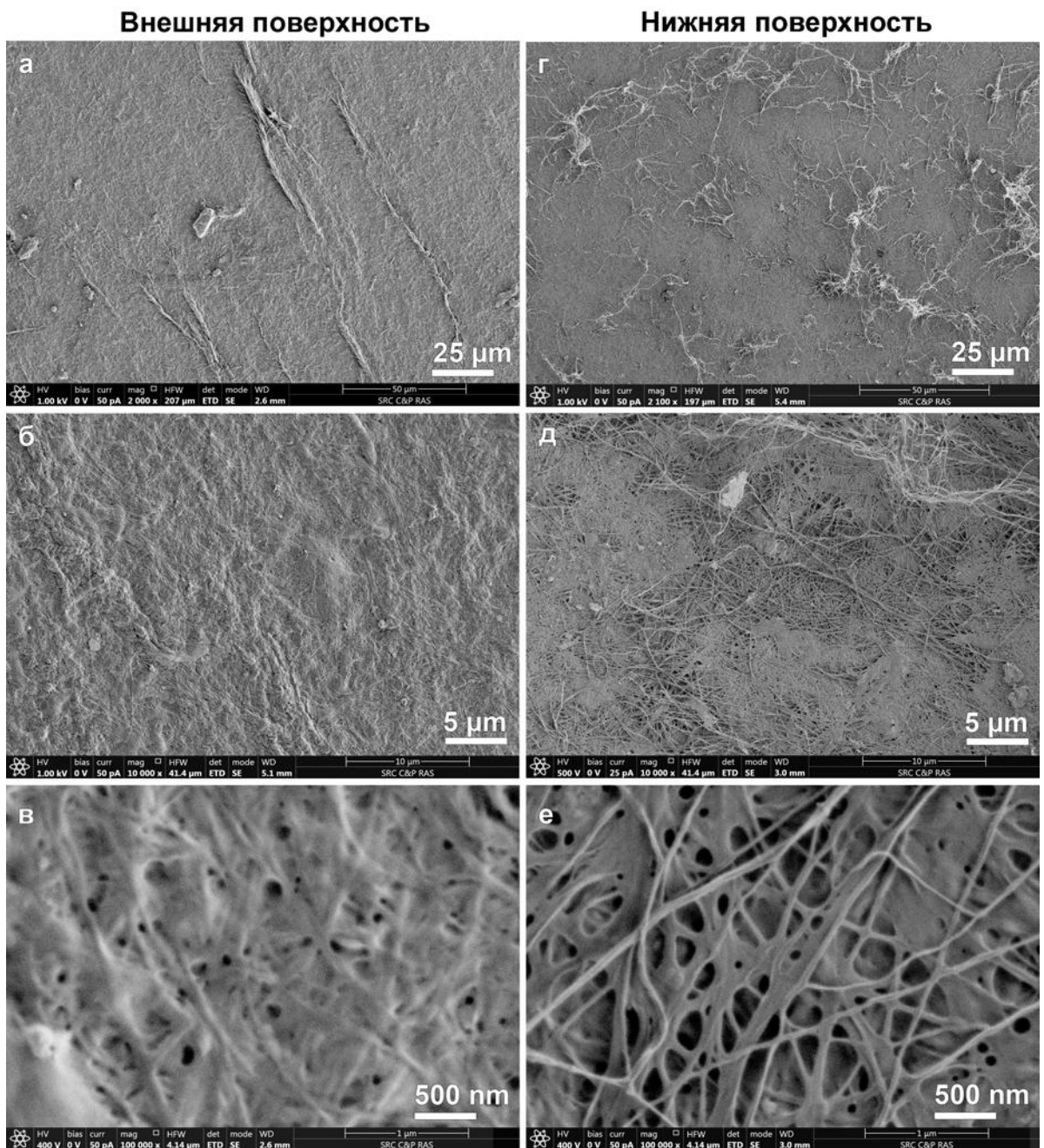


Рис.3.8. Изображения верхней (а, б, в) и нижней (г, д, е) поверхностей высушенной нано-гель-пленки ЦГХ при разном увеличении.

Отметим, что нижняя часть нано-гель- пленки (погруженная в питательный раствор) имеет более рыхлую консистенцию по сравнению с верхней (находящейся над раствором) что подтверждается выше полученными данными о морфологии поверхностей. Видно, что верхняя поверхность плотная, на ней отсутствуют поры больших размеров (Рис.3.8 в). На нижней же поверхности целлюлозы (Рис.3.8 е) в значительной мере развита сетка взаимопроникающих пор.

Количественное описание размеров пор на разных поверхностях нано-гель- пленки ЦГХ представлено на Рис.3.9. Значения диаметра пор на верхней поверхности целлюлозы варьируются от нескольких единиц до ста нанометров. Максимальный размер пор для нижней поверхности составляет 500 нм. Видно, что верхней поверхности соответствует узкое распределение пор по размерам с максимумом ~ 10 нм. На нижней поверхности эта характеристика имеет широкое распределение с максимальным значением ~ 30 нм.

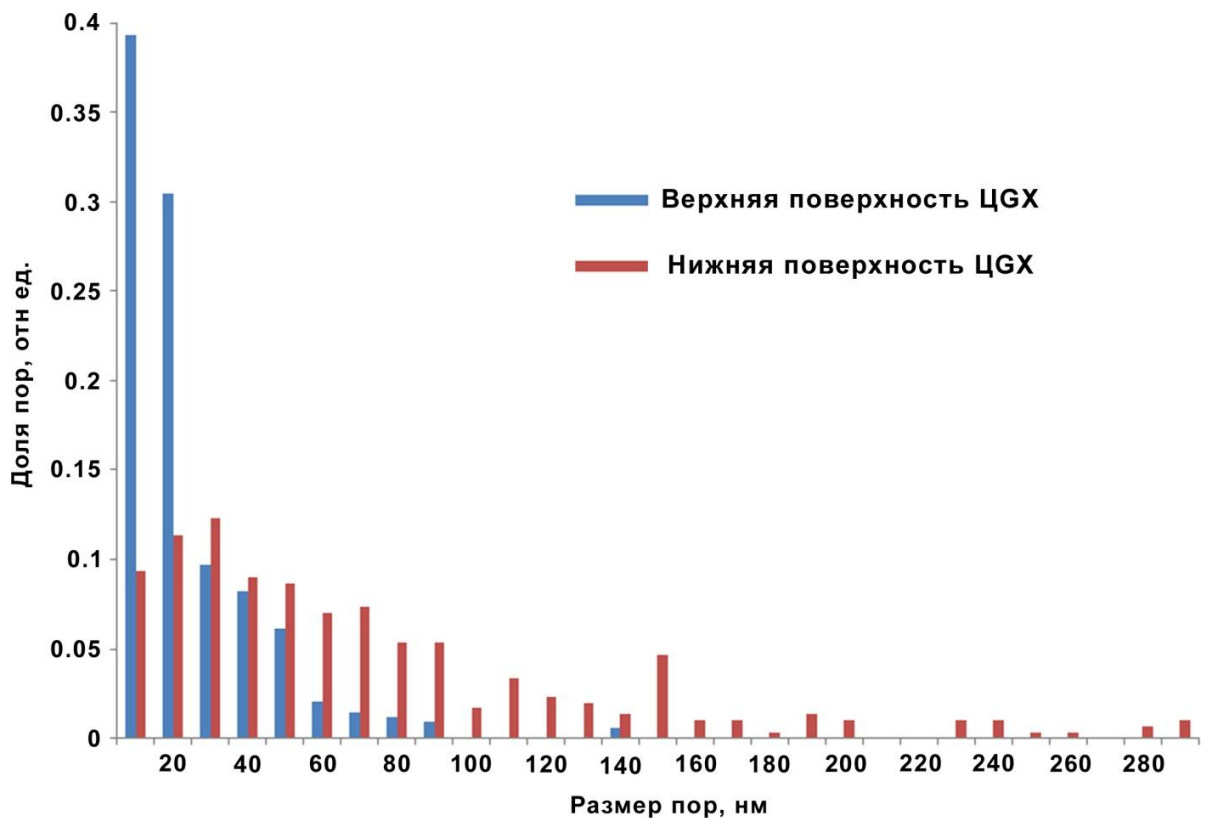


Рис.3.9. Гистограмма распределения пор по размерам на верхней и нижней поверхностях нано-гель-пленки целлюлозы GX.

Фрагменты целлюлозной нано-гель-пленки, полученные после дезинтеграции при скорости вращения блендера 2000 об./мин и 15 000 об./мин приведены на Рис.3.10. Здесь присутствуют как отдельные целлюлозные волокна, так и их конгломераты размером ~ 500 мкм для целлюлозы, дезинтегрированной при скорости 2000 об./мин и размером ~ 300 мкм при 15 000 об./мин.

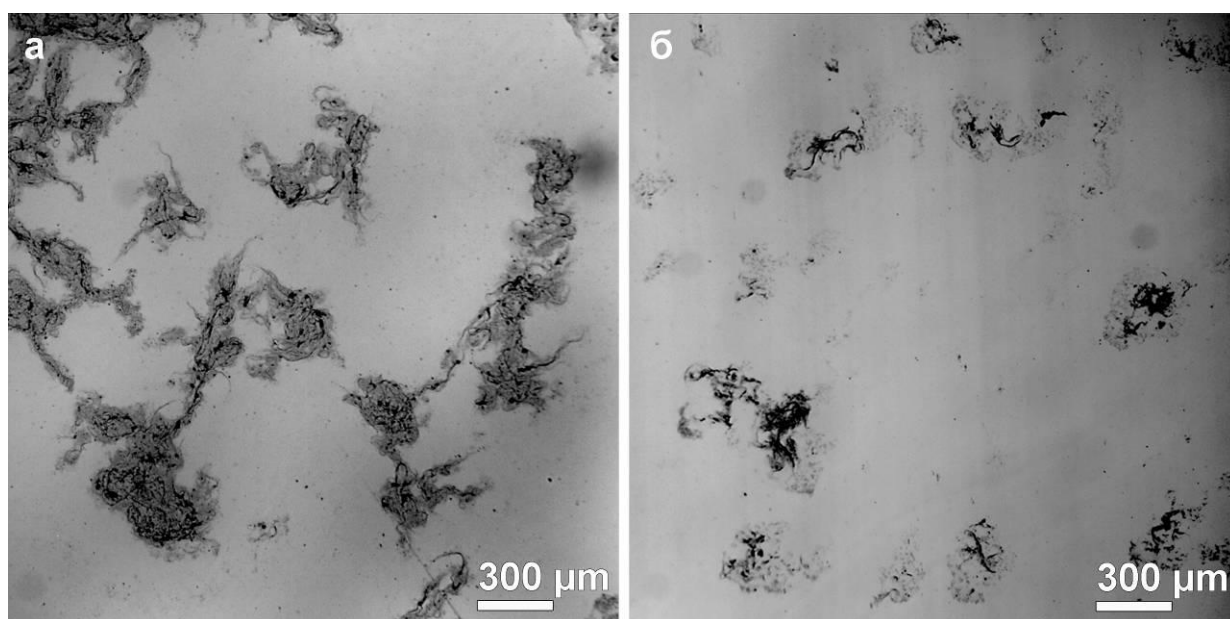


Рис.3.10. Изображение фрагментов нано-гель-пленки ЦГХ после дезинтегрирования при скорости 2000 об./мин (а) и 15 000 об./мин (б).

Изображения поверхности пленок на основе суспензий ЦГХ, полученных при дезинтегрировании нано-гель-пленки ЦГХ при разных скоростях вращения блендера представлены на Рис.3.11.

Видно, что дезинтегрирование в лабораторном блендере приводит при формировании из полученных суспензий пленок к образованию более шероховатой поверхности по сравнению с поверхностью исходной нано-гель-пленки (Рис.3.11 а, г). Распределение пор по размерам для обоих вариантов скоростей дезинтегрирования, а также для верхней поверхности исходной нано-гель-пленки представлены на Рис.3.12. В обоих случаях отмечается довольно узкое распределение пор по размерам как и в случае верхней поверхности ЦГХ, с учетом резкого уменьшения пор диаметром менее 10 нм.

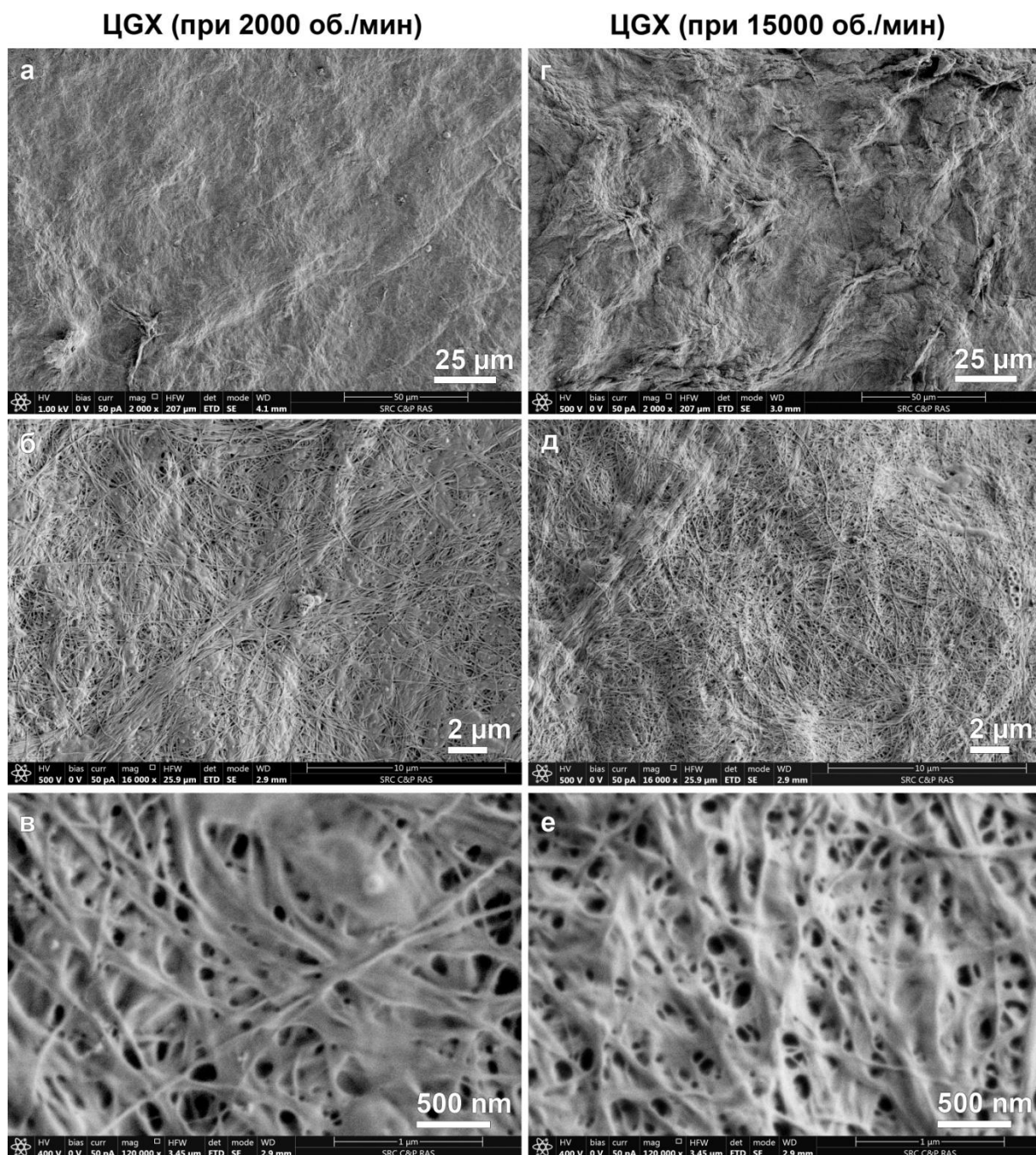


Рис.3.11. Изображения поверхности высушенных пленок, полученных из суспензий после дезинтегрирования нано-гель-пленки ЦГХ при скоростях 2 000 об./мин (а, б, в) и 15 000 об./мин (г, д, е).

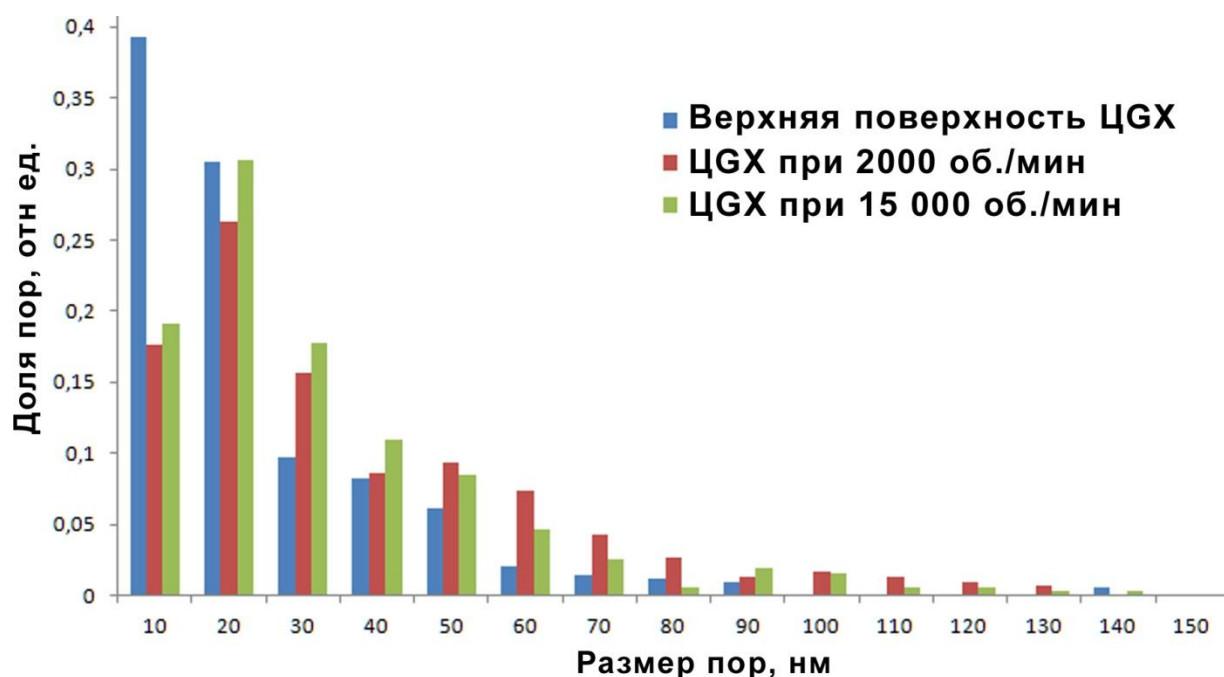


Рис.3.12. Гистограмма распределения пор по размерам на верхней поверхности высушенной нано-гель-пленки ЦГХ, а также на поверхностях высушенных пленок целлюлозы из суспензий, полученных дезинтегрированием при скорости 2000 об./мин, и при 15 000 об./мин.

3.3. Особенности текстуры исходной и дезинтегрированной пленок ЦГХ

На Рис 3.13. представлены дифракционные картины, снятые при перпендикулярном падении рентгеновского пучка относительно плоскости исходной нано-гель-пленки (кривая 1) и высушенной из суспензии ЦГХ (кривая 2) при комнатной температуре. Видно, что положение и интенсивность рефлексов на дифракционных картинах идентичны, что свидетельствует о том, что структура ЦГХ сохраняется и после дезинтегрирования. Кроме того, присутствие интенсивного рефлекса 110 ($2\theta = 17^\circ$) по сравнению с менее интенсивным рефлексом -110 ($2\theta=15^\circ$) показывает, что высушенная пленка, полученная на основе дезинтегрирования ЦГХ, обладает аксиально–плоскостной текстурой, аналогичной текстуре исходной гель-пленки целлюлозы GX.

Внутренняя структура высушенной исходной и дезинтегрированной при разных скоростях гель пленок представлены на Рис.3.14.

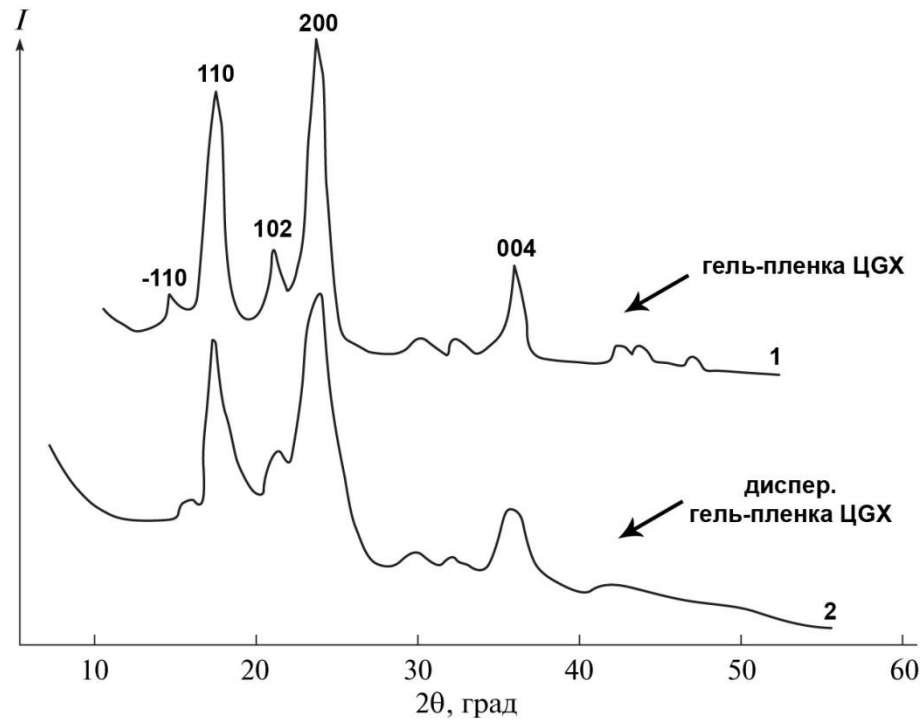


Рис.3.13. Дифрактограммы, полученные при перпендикулярном падении рентгеновского пучка относительно плоскостей нативной (1) и дезинтегрированной при 2000 об./мин (2) пленок ЦГХ.

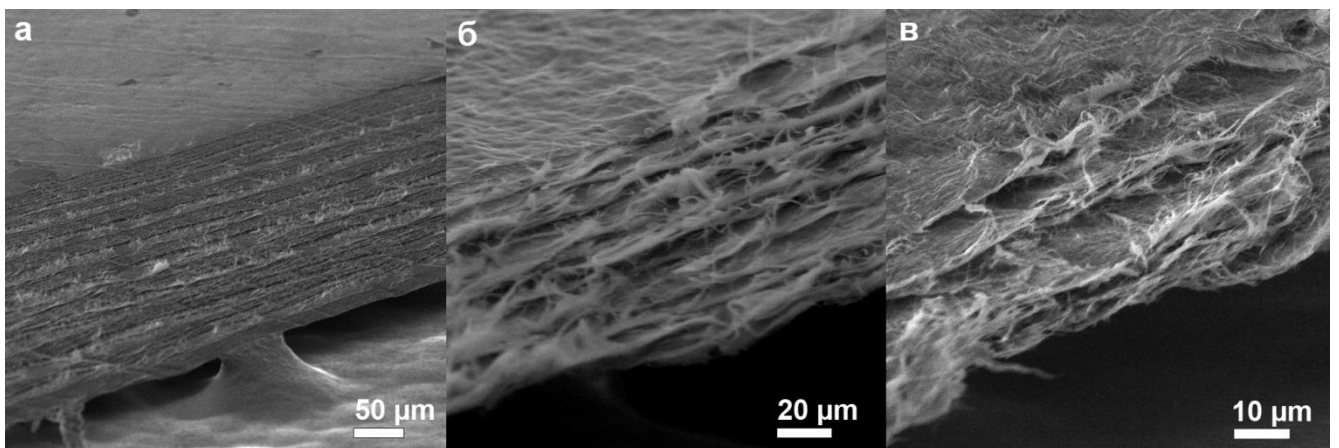


Рис.3.14. Изменение микроструктуры боковой и верхней поверхности исходной нано-гель- пленки (а) и пленок, полученных из суспензий после ее дезинтегрирования при 2 000 об./мин (б) и 15 000 об./мин (в).

Текстурированность высушенных пленок из дезинтегрированной целлюлозы сохраняется, несмотря на отсутствие четкой укладки листов, наблюдаемой в исходной нано-гель-пленки. В литературных источниках отмечается факт склонности полимерных систем к самосборке на границе вода-воздух [170].

Краткое обобщение результатов Главы 3

Оптимизация методики съемки с использованием экспериментально определенной энергией баланса заряда на поверхности $E_2=400$ эВ позволяет детально исследовать методом сканирующей электронной микроскопии морфологию поверхности нано-гель-пленки ЦГХ, а также композитов на ее основе без предварительного напыления защитного покрытия на поверхность образца, приводящего к искажению реальной структуры объекта. Расчеты глубины проникновения электронов в нано-гель-пленку ЦГХ показали, что сигналы вторичных и обратно рассеянных электронов детектируются с приповерхностного слоя глубиной ≤ 4 нм.

Обнаружено, что на верхней поверхности присутствуют поры диаметром от нескольких до ста нанометров, при этом основная доля пор имеет размер до 20 нм. Нижняя поверхность представляет собой «губку» из взаимопроникающих пор разного диаметра от нескольких нанометров до 500 нм с преимущественным размером пор 10-50 нм.

Установлено, что дезинтегрирование нано-гель-пленки в лабораторном блендере приводит к образованию фрагментов микрофибрилл и лент ЦГХ в водном растворе со средним размером 500 мкм (для скорости вращения 2 000 об./мин) и – 300 мкм (для скорости вращения 15 000 об./мин). Отмечается эффект самосборки фрагментов целлюлозы в водных суспензиях: текстура высушенных пленок дезинтегрированной ЦГХ сохраняется. При этом среднее значение пор на поверхности составляет ~ 20 нм, не наблюдаются поры больших размеров (более 150 мкм).

ГЛАВА 4. СТРУКТУРА КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ГЕЛЬ-ПЛЕНКИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ *GLUCONACETOBACTER XYLINUS* И НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА

Изучение механизмов сорбции и десорбции медицинских препаратов в матрицу нано-гель-пленки ЦГХ чрезвычайно важно для оптимизации метода их интеркаляции. Полученные данные о безопасных концентрациях наночастиц необходимы для эффективного применения данного препарата в медицине.

Настоящая глава посвящена структурным исследованиям композитов на основе нано-гель-пленки бактериальной целлюлозы с внедренными наноконструкциями селена, стабилизированными поли-N-винилпирролидоном. Фазовый состав и размер наночастиц, а также структура композита ЦГХ с сорбированными наноконструкциями были проведены методами электронной микроскопии и электронной дифракции.

4.1. Структура наночастиц селена в коллоидном растворе

Наночастицы селена в растворе получали в процессе окислительно-восстановительной реакции в присутствии синтетического полимера поли-N-винилпирролидона (ПВП). Изображения наночастиц селена, стабилизированных ПВП, и соответствующая картина электронной дифракции представлены на Рис.4.1.

Форма частиц близка к округлой. Размеры частиц варьируются от 10 до 100 нм, и распределение носит одномодальный характер (Рис.4.1.в). Согласно дифракционным данным частицы не имеют регулярной кристаллической структуры, дифракционная картина состоит из размытых колец (рис.4.1б).

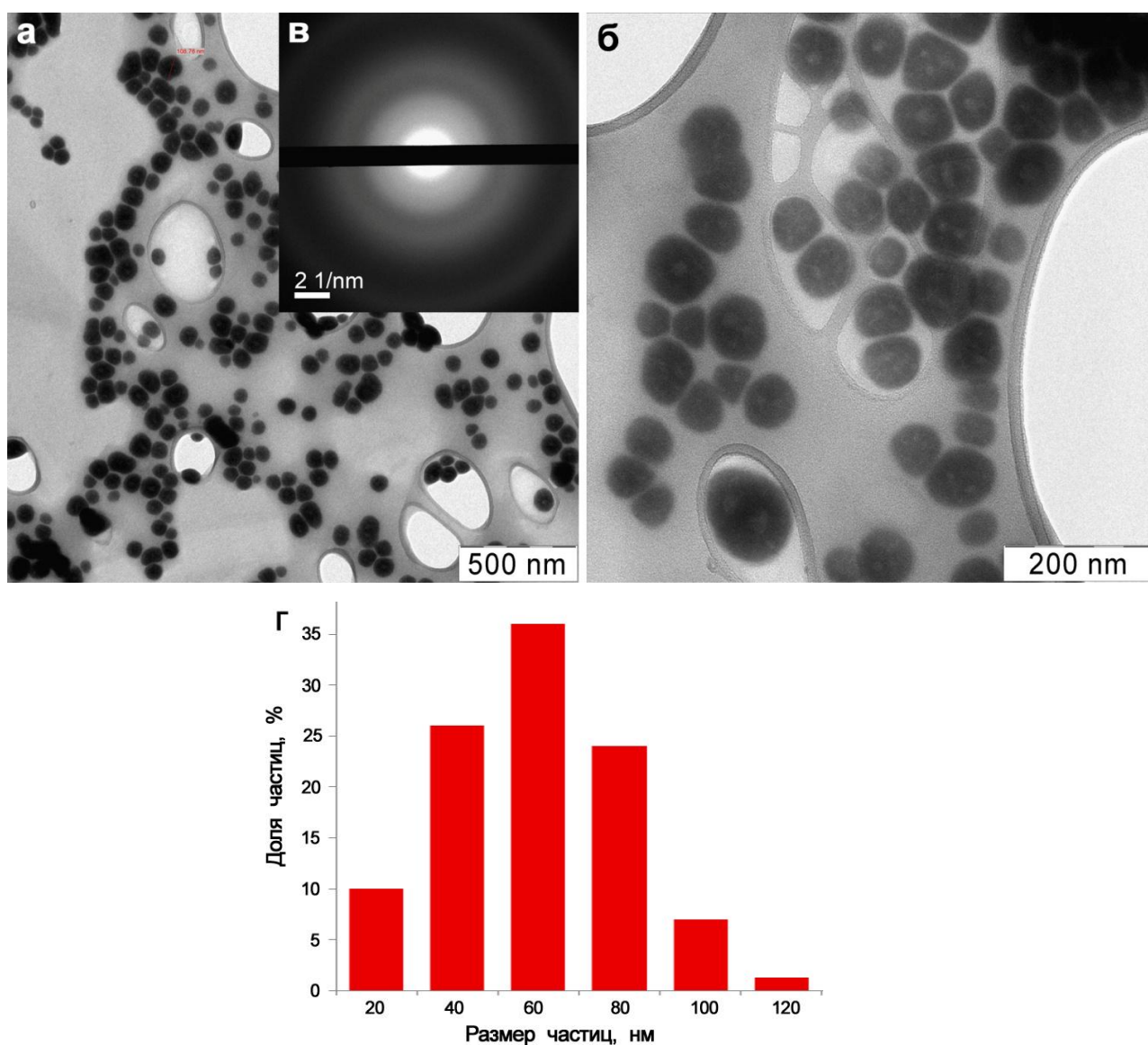


Рис.4.1. Наночастицы селена (а, б) и соответствующая картина электронной дифракции (в). Распределение наночастиц селена по размерам (г).

4.2. Структура композитов на основе nano-гель- пленки ЦГХ/ nano-селен

СЭМ-изображения поверхности композита nano-гель-пленка ЦГХ/nano-селен представлены на рис.4.2. Частицы селена располагаются как на поверхности фибрилл ЦГХ, так и в межфибрилярном пространстве. Характерно, что наночастицы Se располагаются на поверхностных фибриллах как на верхней, так и на нижней поверхности независимо от степени пористости.

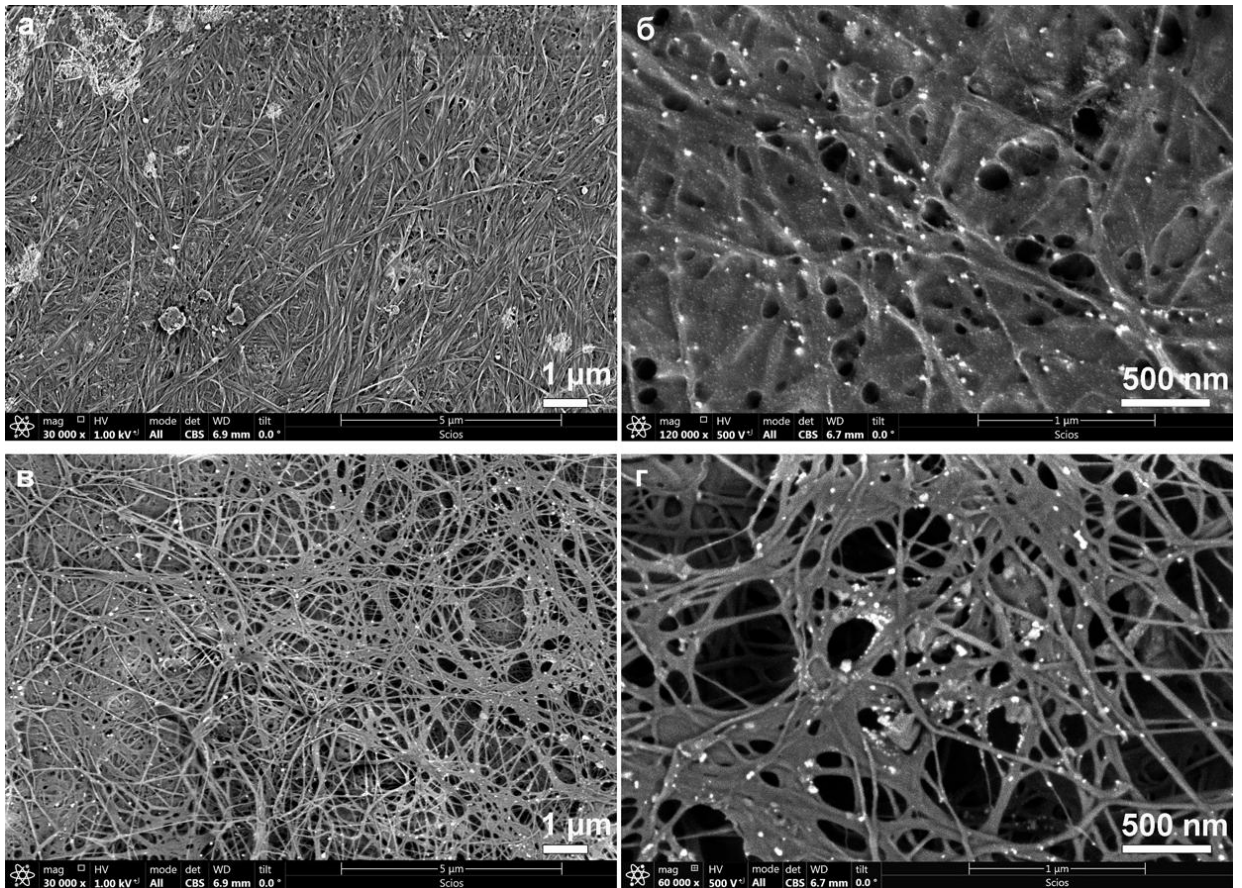


Рис.4.2. СЭМ-изображения верхней (а, б) и нижней (в, г) поверхностей композитов nano-гель-пленка ЦГХ/nano-селен при увеличениях 30 000 (слева) и 120 000 (справа). Изображения получены при ускоряющем напряжении 5 кВ(а, в) и 4,5 кВ (б, г) и подачей напряжения на образец 4кВ.

Для изучения распределения наночастиц в nano-гель-пленке ЦГХ после выдерживания ее в растворе, содержащем наночастицы Se^0 , пленку композита высушивали, заливали эпоксидной смолой и с помощью микротомы готовили поперечные срезы толщиной 70- 100 нм. Электронно-микроскопическое изображение поперечного сечения композита nano-гель-пленки ЦГХ/nano-селен с 1% содержанием селена представлено на Рис.4.3. Видно, что распределение наночастиц селена на поверхностях и в объеме пленки является неравномерным. Наблюдается различие в количестве и размерах кластеров наночастиц, адсорбированных на верхней и нижней поверхностях пленок, что связано с особенностями морфологии nano-гель- пленки ЦГХ, формирующейся в процессе биосинтеза, о чем было подробно описано в Главе 3.

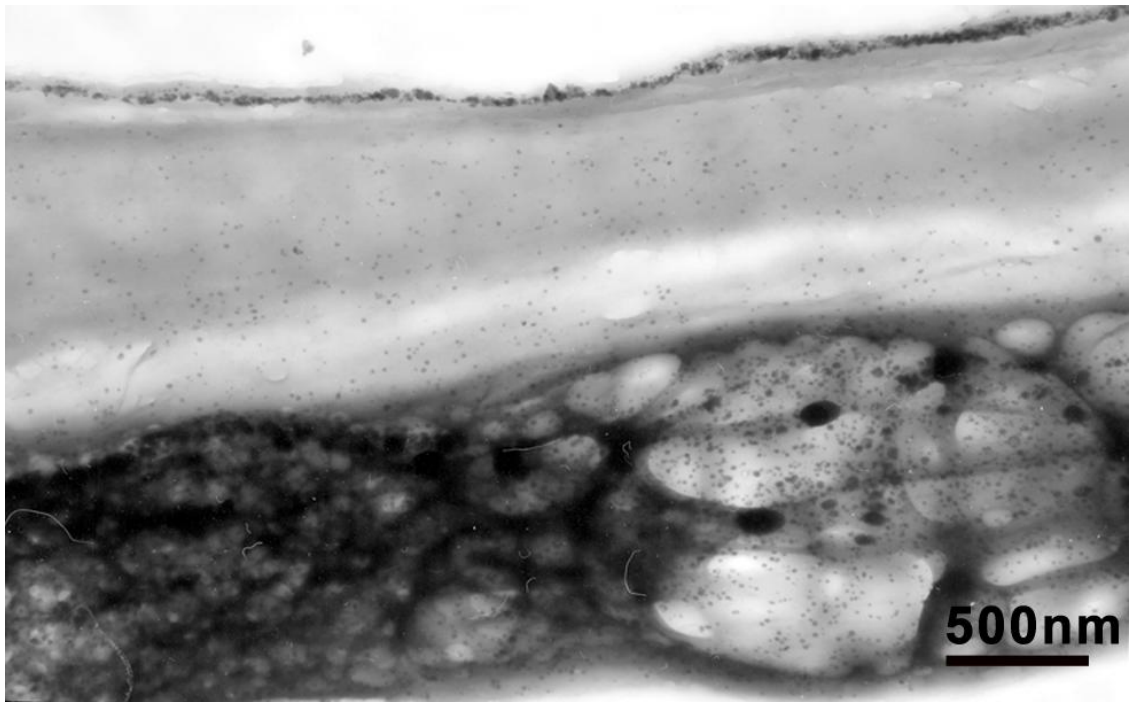


Рис.4.3. ПЭМ-изображение поперечного сечения nano-гель-пленки ЦГХ/нано-селен. Распределение наночастиц селена в архитектуре гель-пленки ЦГХ является неравномерным.

Гистограммы распределения наночастиц селена по размерам в nano-гель-пленке ЦГХ/нано-селен приведены на Рис. 4.4. На верхней поверхности пленки локализуются кластеры частиц в основном крупных размеров, от 20 до 60 нм. Гистограмма распределения наночастиц Se в глубине пленки имеет узкую ширину с максимумом в интервале от нескольких нанометров до 20 нм. Это связано с наличием определенного размера пор в микрофибриллярной сетке на верхней поверхности nano-гель- пленки, средний размер которых по выше полученным данным СЭМ составляет ~ 10 - 20 нм. Таким образом, верхняя поверхность nano-гель-пленки обладает свойствами мембраны, позволяющей фильтровать наночастицы по размерам. Нижняя поверхность гель-пленки ЦГХ обладает достаточно большими межфибриллярными пустотами, что позволяет проникать наночастицам Se больших размеров вплоть до 120 нм глубоко в объем матрицы, а гистограмма распределения наночастиц в нижней части nano-гель-пленке схожа с исходной гистограммой распределения наночастиц Se в растворе (Рис.4.1.г).

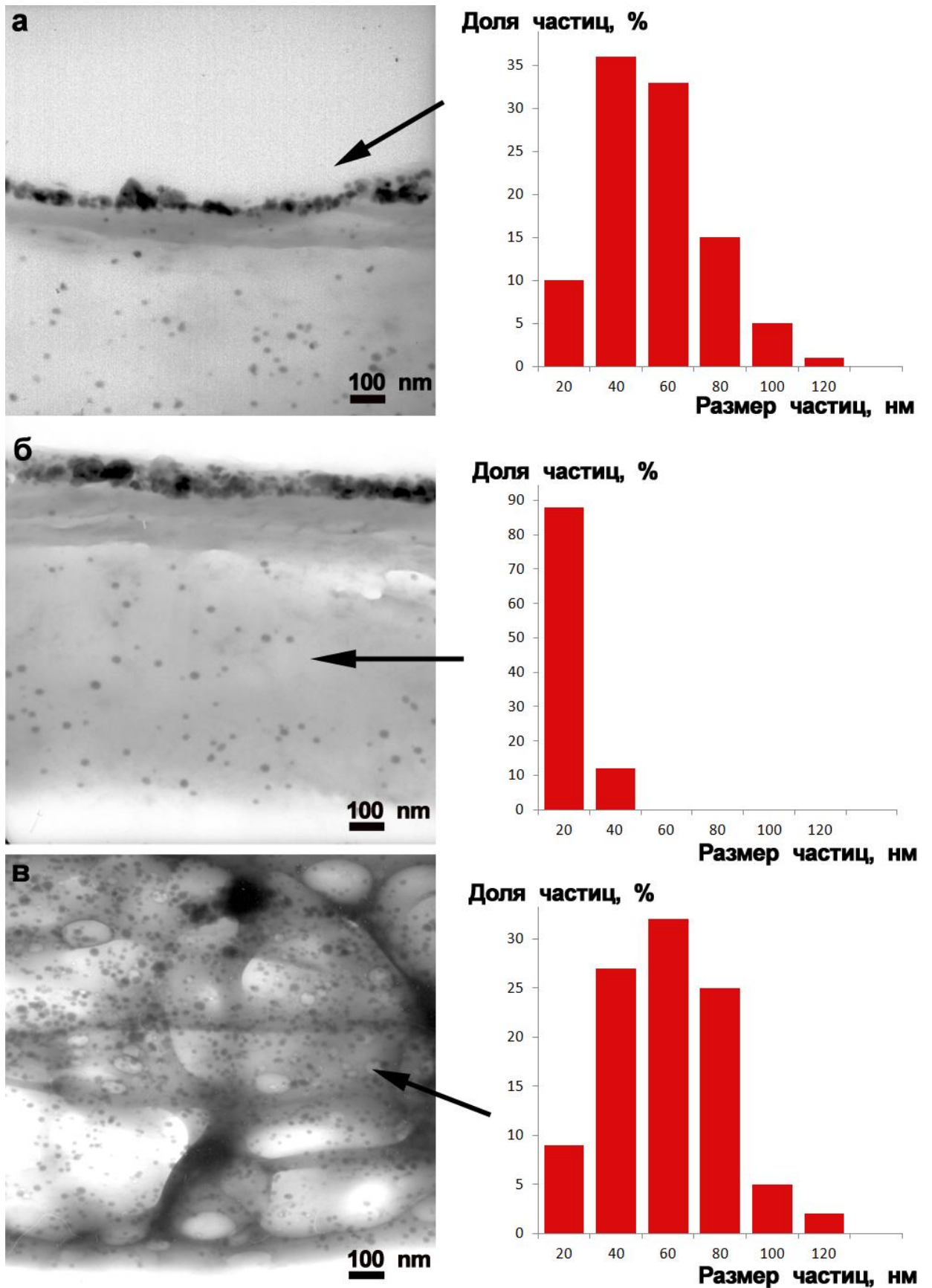


Рис.4.4. Электронно-микроскопическое изображения наночастиц Se на внешней поверхности – (а), внутри гель-пленки – (б), в нижней части гель-пленки – (в) и соответствующие гистограммы распределения наночастиц по размерам.

После внедрения в гель-пленку бактериальной целлюлозы наночастицы селена меняют свою структуру и становятся кристаллическими. Эти изменения структуры наночастиц Se подтверждаются проведенными ранее исследованиями наночастиц, полученных из водных растворов с органическим стабилизатором ПВП, до и после введения бактериальной целлюлозы в раствор [96]. Изображение наночастиц селена в гель-пленке ЦГХ приведено на Рис.4.5. Картина электронной микродифракции от 50- нанометровой частицы в центре отвечает селену моноклинной модификации. Детальный фазовый анализ наночастиц селена из растворов, содержащих nano-гель-пленку ЦГХ, был выполнен в работе [96], где с помощью моделирования ВРЭМ- изображений и фурье-преобразования был однозначно определен фазовый состав наночастиц Se, отвечающий моноклинной модификации (P121/N1) с параметрами элементарной ячейки $a = 9,05 \text{ \AA}$, $b = 9,07 \text{ \AA}$, $c = 11,61 \text{ \AA}$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 90,77^\circ$.

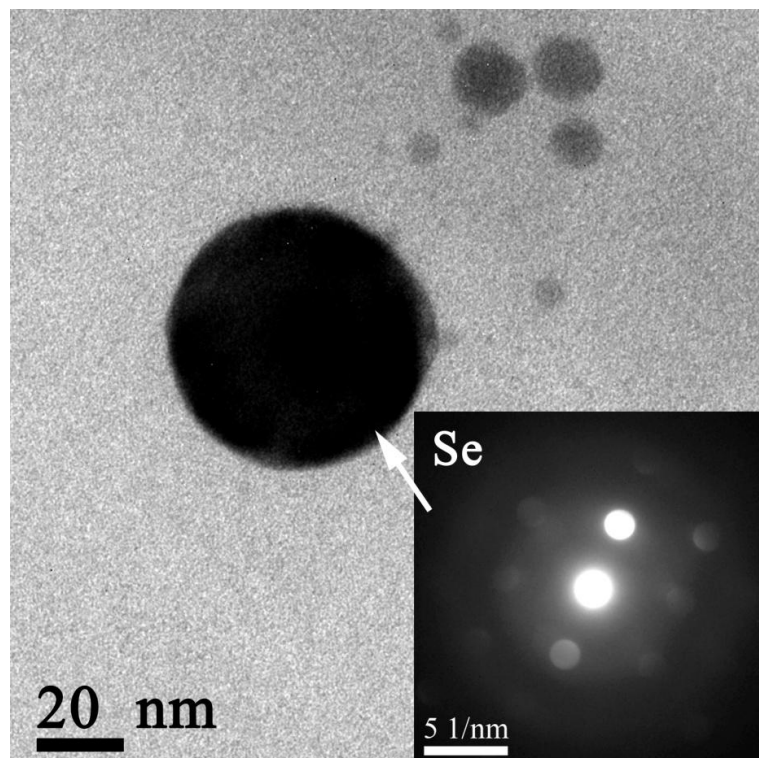


Рис.4.5. Частицы селена в гель-пленке бактериальной целлюлозы, электронограмма от частицы в центре.

4.3. Структура композитов на основе nano-гель-пленки ЦГХ и наночастиц из раствора, содержащих одновременно ионы селена и серебра

Целью данного эксперимента было установление различий в сорбции наночастиц селена в матрицу гель-пленки ЦГХ при изменении концентрации ПВП/Se от 0,01 до 1% с добавлением примеси серебра. ПЭМ изображения срезов полученных образцов представлены на Рисунке 4.6. При увеличении концентрации ПВП/Se в растворе увеличивается и количество сорбируемых в матрицу наночастиц. Видно, что частицы шириной от 5 нм до 25 нм и длиной от 8 нм до 40 нм имеют эллипсоидальную форму как на поверхности, так и в глубине nano-гель-пленки. Энергодисперсионный анализ показал, что в состав таких частиц входит селен и серебро, усредненное соотношение по образцу - $Ag/Se \cong 0.45$ (Рис.4.6). (Пики Cu, Fe и Ni появляются вследствие рассеяния на медной поддерживающей сетке и полюсных наконечниках электронного микроскопа).

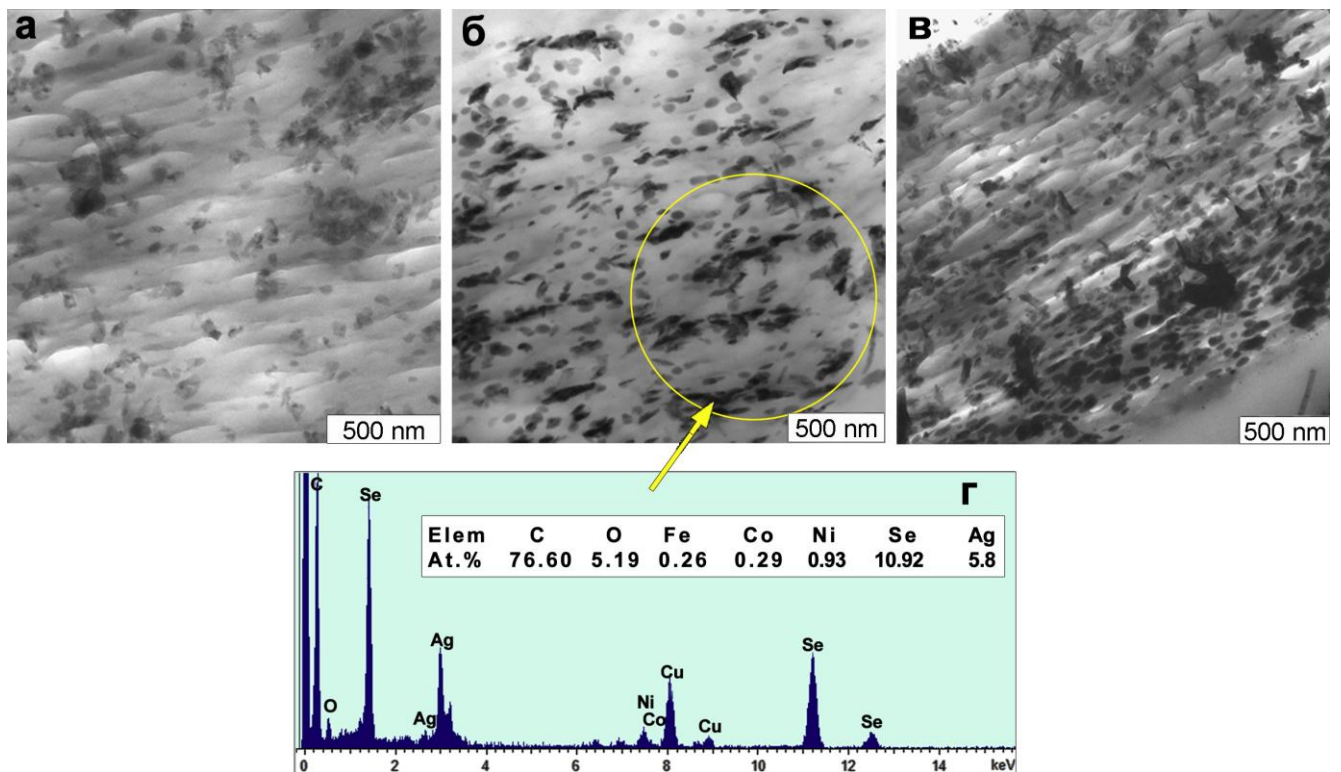
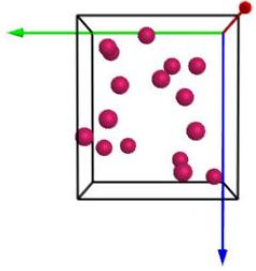
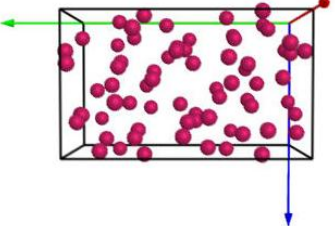
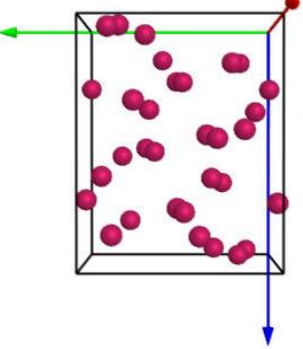
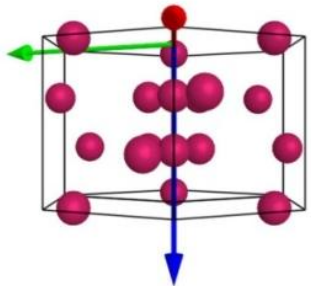
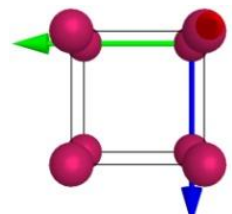
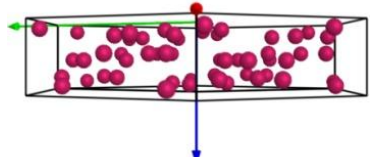
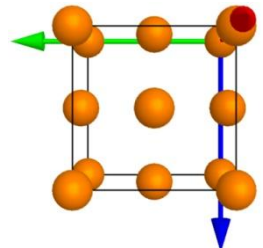
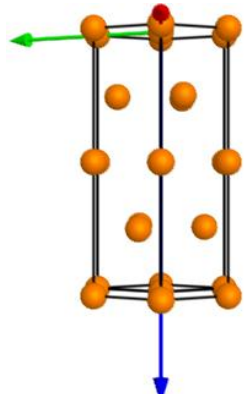
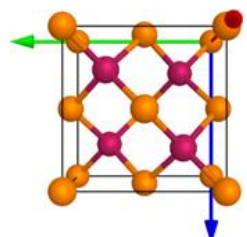


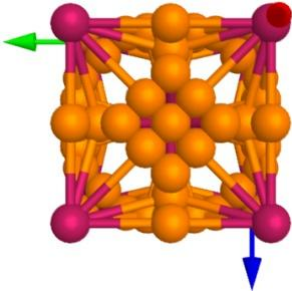
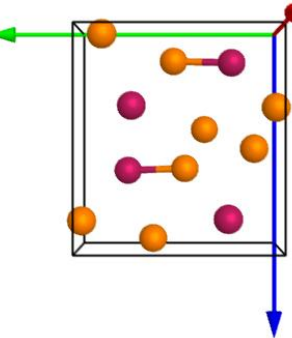
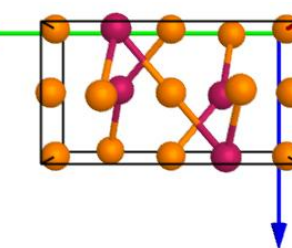
Рис.4.6. ПЭМ-изображения композитов ЦГХ/ПВП-Se при концентрациях ПВП-Se 0,1% (а), 0,5% (б), 1% (в). ЭДС-спектр от наночастиц в nano-гель-пленке (г).

Интерпретация картины электронной дифракции, полученных от скоплений частиц (рис.4.7 а), проводилась с учетом данных элементного состава в программе JEMS. Для определения фазового состава частиц в расчет были взяты все известные соединения серебра и селена. Их параметры перечислены в Таблице 4.1.

Таблица 4.1. Кристаллографические параметры модификаций селена, серебра и их соединений, используемые для моделирования картин электронной дифракции

Формула	Пространственная группа	Параметры элементарной ячейки	Модель проекции элементарной ячейки вдоль [100]
Se (β -Se)	P121/A1	$a=12,85\text{\AA}$; $b=8,07\text{\AA}$; $c=9,31\text{\AA}$; $\alpha=\gamma=90^\circ$, $\beta=93,13^\circ$ [171]	
Se (γ -Se)	P121/C1	$a=15,02\text{\AA}$; $b=14,71\text{\AA}$; $c=8,78\text{\AA}$; $\alpha=\gamma=90^\circ$, $\beta=93,61^\circ$ [172]	
Se (α -Se)	P121/N1	$a=9,05\text{\AA}$; $b=9,07\text{\AA}$; $c=11,61\text{\AA}$; $\alpha=\gamma=90^\circ$, $\beta=90,77^\circ$ [173]	

Se	P3121	$a = b = 4,35 \text{ \AA}; c = 4,96 \text{ \AA};$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$ [174]	
Se	PM3-M	$a = b = c = 2,982 \text{ \AA};$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ [175]	
Se	R3-H	$a = b = 11,36 \text{ \AA}; c = 4,429 \text{ \AA};$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$ [176]	
Ag	FM-3M	$a = b = c = 4,085 \text{ \AA};$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ [177]	
Ag	P63/MMC	$a = b = 2,93 \text{ \AA}; c = 4,79 \text{ \AA};$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$ [178]	
AgSe	F4-3M	$a = b = c = 5,65 \text{ \AA};$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ [179]	

Ag ₂ Se	IM3-M	$a = b = c = 4,983 \text{ \AA};$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ [180]$	
Ag ₂ Se	P212121	$a = 4,33 \text{ \AA}; b = 7,062 \text{ \AA};$ $c = 7,764 \text{ \AA};$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ [181]$	
Ag ₂ Se	P2221	$a = 7,05 \text{ \AA}; b = 7,85 \text{ \AA};$ $c = 4,333 \text{ \AA};$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ [182]$	

В программе последовательно сравнивали расчетные электронограммы для каждого соединения с экспериментальной дифракционной картиной. По распределению рефлексов на электронограмме были выбраны те фазы, межплоскостные расстояния для которых совпадают с присутствующими на исходной электронограмме в пределах ошибки измерений. В результате были отобраны два соединения: ромбический Ag₂Se (Рис.4.6 б) и тригональный Se (Рис.4.7 в). Анализ интенсивностей рефлексов на электронограммах подтвердил, что мы имеем дело с двумя фазами одновременно. На Рисунке 4.7 представлены расчетные дифракционные картины Ag₂Se ($a=4,333 \text{ \AA}$, $b=7,062 \text{ \AA}$, $c=7,764 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$) и Se ($a=b=4,3 \text{ \AA}$, $c=4,89 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$), совмещенные с экспериментальной электронограммой (а).

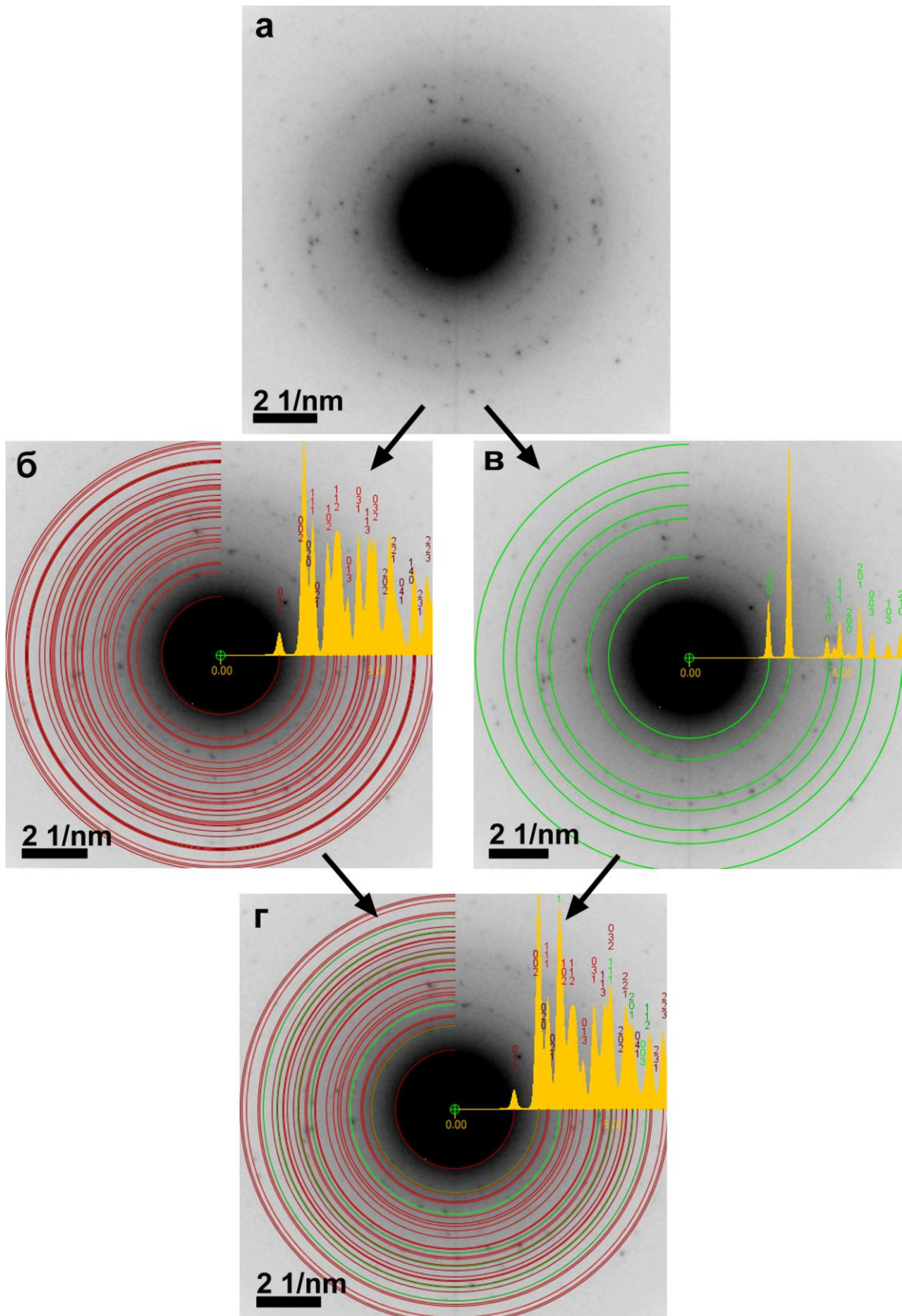


Рис.4.7. Картина электронной дифракции от наночастиц в нано-гель- пленке ЦГХ (а). Совмещение исходной электронограммы с расчетными для ромбического Ag_2Se (б), тригонального Se (в) и двух фаз Ag_2Se и Se (г).

В образцах с концентрацией ПВП-Se 1% на поверхности композита, (на границе ЦГХ и эпоксидной смолы) были обнаружены нанопроволоки толщиной порядка 50-70 нм и длиной до нескольких микрон (Рис.4.8). ЭДС-спектр показал, что нанопроволоки, в отличие от наночастиц, содержат исключительно селен.

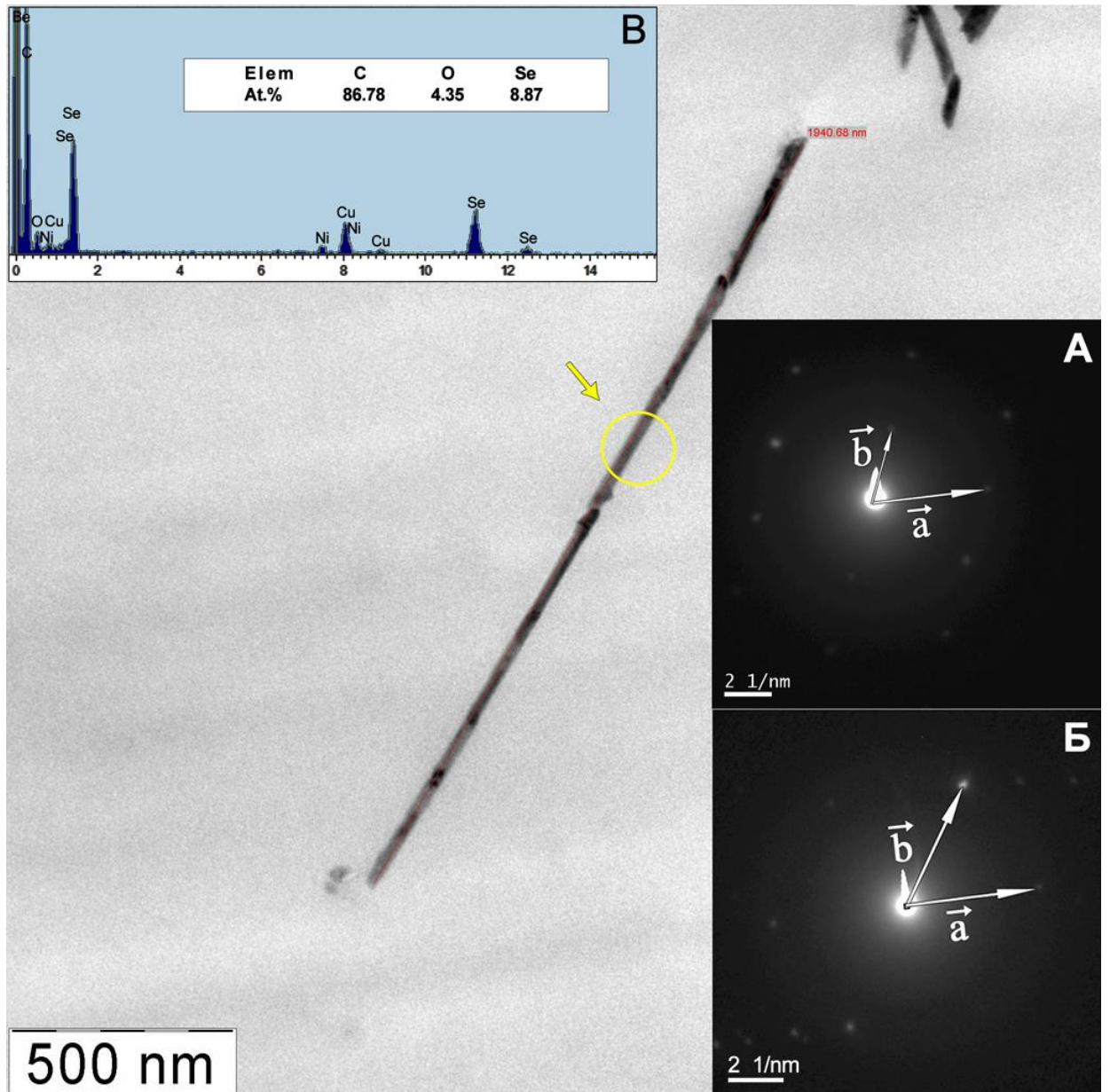


Рис.4.8. ПЭМ-изображение нанопроволоки селена и картины электронной дифракции от неё, полученные при вращении образца на угол -0.6° (А), -10.6° (Б). ЭДС-спектр от нанопроволоки (В).

Фазовый анализ нанопроволок селена был проведен с помощью метода вращения [17]. Дифракционные картины от нанопроволоки на просвет представлены на Рис.4.8. А, Б. Полученные электронограммы сравнивали с моделированными в программе JEMS для известных фаз селена. Межплоскостные расстояния на электронограммах были измерены в программе Digital Micrograph, при этом ошибка измерений составила 1% для углов между векторами обратного пространства и 3% для межплоскостных расстояний. На электронограмме Рис.4.8 А $a_1^* = 4,88 \text{ 1/nm}$, $b_1^* = 3,27 \text{ 1/nm}$, $(a_1^* \wedge b_1^*) = 67,8$, на второй (Рис.4.8 Б) - $a_2^* = 4,80 \text{ 1/nm}$, $b_2^* = 4.79 \text{ 1/nm}$, $(a_2^* \wedge b_2^*) = 59^\circ$. Дифракционные картины были расшифрованы в моноклинной и тригональной модификации селена. На Рис. 4.9 приведены стереографические проекции с осями зон в рамках которых были расшифрованы экспериментальные дифракционные картины.

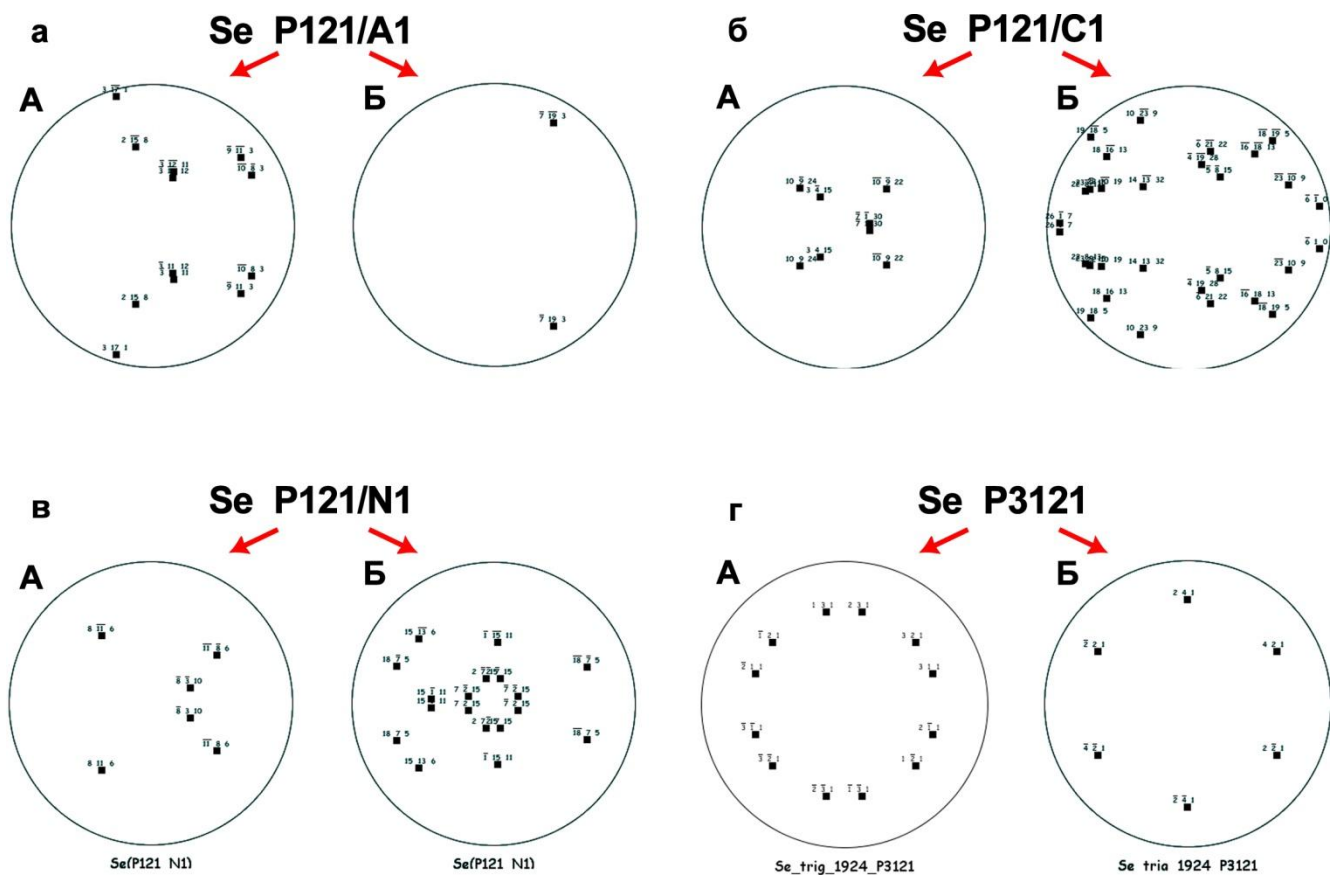


Рис.4.9. Стереографические проекции с осями зон, в которых расшифровывались экспериментальные дифракционные картины, для моноклинных (а, б, в) и тригональной (г) модификации селена.

Для уточнения фазы селена был произведен расчет угла между осями зон для моделированных дифракционных картин, соответствующих электронограмме 4.8.А и 4.8 Б. Наилучшее совпадение расчетных электронограмм и экспериментальных было получено для тригональной модификации селена с параметрами элементарной ячейкой $a=b=4,35\text{\AA}$, $c=4,96\text{\AA}$, $R312$. На рисунке 4.10 представлены расчетные электронограммы для осей зон $[14-53]$ (А) $[02-21]$ (Б) тригональной модификации селена. Соответствующие оси зон отмечены на стереографической проекции. Угол между осями зон для тригональной фазы селена равен 10° , что хорошо согласуется с экспериментальным углом вращения образца ($\sim 10^\circ$)

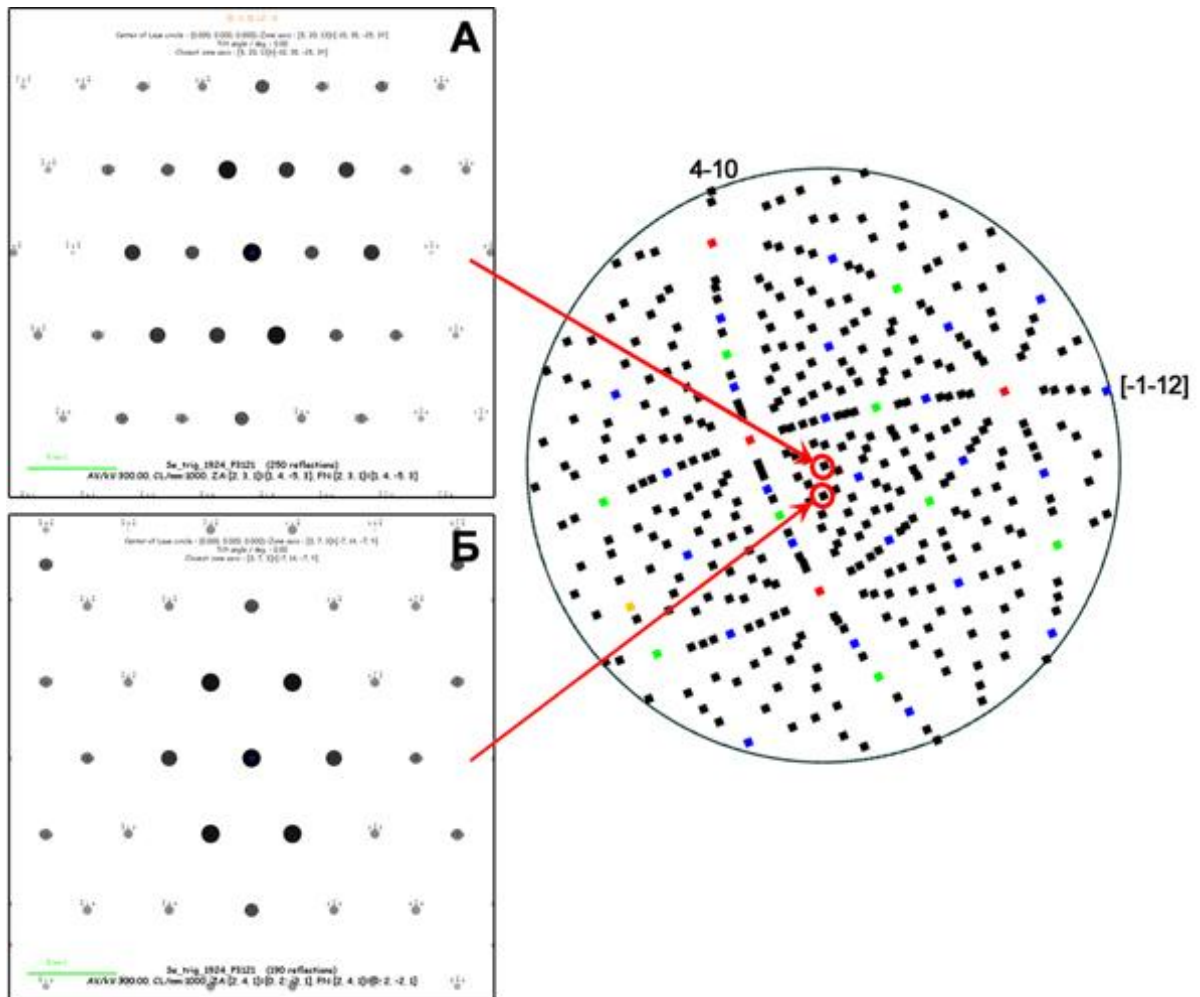


Рис.4.10. Расчетные электронограммы для осей зон $[14-53]$ (А) и $[02-21]$ (Б) тригональной модификации селена. Соответствующие оси зон показаны на стереографической проекции, (угол между осями зон $\sim 10^\circ$).

Краткое обобщение результатов Главы 4

Исследование структуры тонких срезов нано-гель-пленки ЦГХ с сорбированными наночастицами чрезвычайно важно для установления особенностей взаимодействия композитной матрицы с наполнительным компонентом, обнаружения взаимных структурных изменений, а также наличия побочных образований.

Показано, что интеркаляция наночастиц Se в гель-пленку ЦГХ происходит по-разному относительно верхней и внутренней поверхностей. Верхняя поверхность ЦГХ по функциям сходна с «мембраной»: способна пропускать внутрь частицы размерами от 10 до 25 нм, большие же частицы размерами от 40 до 100 нм располагаются на поверхности. Подтвержден факт кристаллизации аморфных наночастиц Se в моноклинную модификацию в гель-пленке бактериальной целлюлозы.

Обнаружены структурные изменения наночастиц Se при добавлении следовых количеств серебра. В матрице ЦГХ наблюдаются эллипсоидальные наночастицы, представляющие собой смесь кристаллитов селена (тригональная модификация) и селенида серебра (ромбическая модификация). На поверхности композита (в образцах с концентрациями ПВП-Se = 1%) выявлены нанопроволоки чистого селена длиной до нескольких микрон. По полученным электронограммам от нанопроволок в программе JEMS было проведено моделирование и определено, что нанопроволоки кристаллизуются в тригональную фазу селена.

Попытка одновременного введения ионов селена или серебра из растворов поливинилпирролидона в матрицу нано-гель-пленки ЦГХ приводит к образованию в композите помимо наночастиц селена, наночастиц селенида серебра и нанопроволок селена, что может негативно сказаться на применении этих композитов в качестве раневых покрытий.

ГЛАВА 5. МОРФОЛОГИЯ, СТРУКТУРА И СВОЙСТВА КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ *GLUCONASETOBACTER XYLINUS* И НАНОКРИСТАЛЛОВ ГИДРОКСИАПАТИТА

В настоящей главе представлены результаты исследования морфологии, структуры и свойств композитов на основе бактериальной целлюлозы и нанокристаллов гидроксиапатита при варьировании способа получения композитов и соотношения компонентов. Такой подход обусловлен поиском биоматериалов, обладающих характеристиками наиболее близкими к естественной кости. Структурные исследования композитов были проведены методами рентгеновской дифракции, электронной микроскопии и электронной дифракции и включали определение взаимной ориентации компонентов композита, установление размеров и формы наночастиц гидроксиапатита. Определены основные физико-химические свойства полученных 3D композитных материалов: плотность, пористость, удельная поверхность, объем и размер пор, модуль Юнга.

5.1. Структура нанокристаллов ГАП

Гидроксиапатит (ГАП), синтезируемый из водных растворов при низкой температуре по методике [116], представляет собой наноразмерные пластинчатые кристаллы. На Рис.5.1.a представлено наиболее типичное изображение агломерированных наночастиц ГАП и электронограмма, полученная от этого участка. Картина электронной дифракции соответствует гексагональной фазе гидроксиапатита $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ с параметрами элементарной ячейки $a=0.942$ нм, $c=0.684$ нм [110]. Линейные размеры наночастиц ГАП были измерены на темнопольных изображениях, полученных в рефлексе 0002 (Рис.5.1в). Длина нанокристаллов ГАП варьируется от 5 до 100 нм.

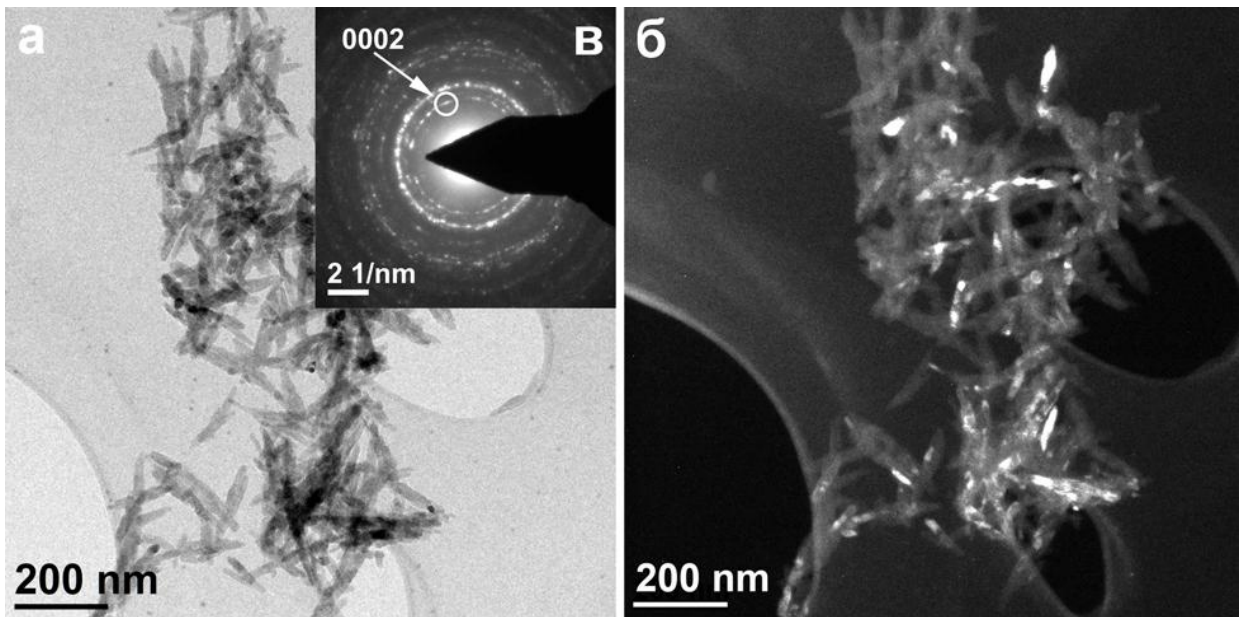


Рис.5.1. ПЭМ-изображение агломерата наночастиц гидроксиапатита, осажденных из раствора - (а) и электронограмма от него – (б), темнопольное изображение, полученное в рефлексе 0002 – (в).

5.2. Структурные особенности композитных пленок на основе дезинтегрированной нано-гель-пленки ЦГХ и нанокристаллов ГАП

Общая информация о структуре композитов была получена с помощью метода рентгеновской дифрактометрии, данные о локальном строении были получены с помощью методов электронной микроскопии и электронной дифракции. Композиты были приготовлены тремя способами с разными массовыми соотношениями компонентов.

5.2.1. Композиты, полученные механическим смешиванием водных суспензий ЦГХ и ГАП

Изображение боковой поверхности композитных пленок ЦГХ/ГАП при малом и больших увеличениях представлено на Рис.5.2. Видно, что наночастицы гидроксиапатита располагаются как между «листами» ЦГХ, так и в плоскости «листа» на фибриллах, образуя агломераты. Однако абсолютно гомогенной

структуры не наблюдается: агломераты нанокристаллов гидроксиапатита, не закрепившиеся на фибриллах ЦГХ, располагаются в объеме образца неравномерно. Стоит отметить, что при увеличении массовой доли ЦГХ в композите морфология боковых сколов становится подобной исходной (недезинтегрированной) нано-гель-пленке ЦГХ.

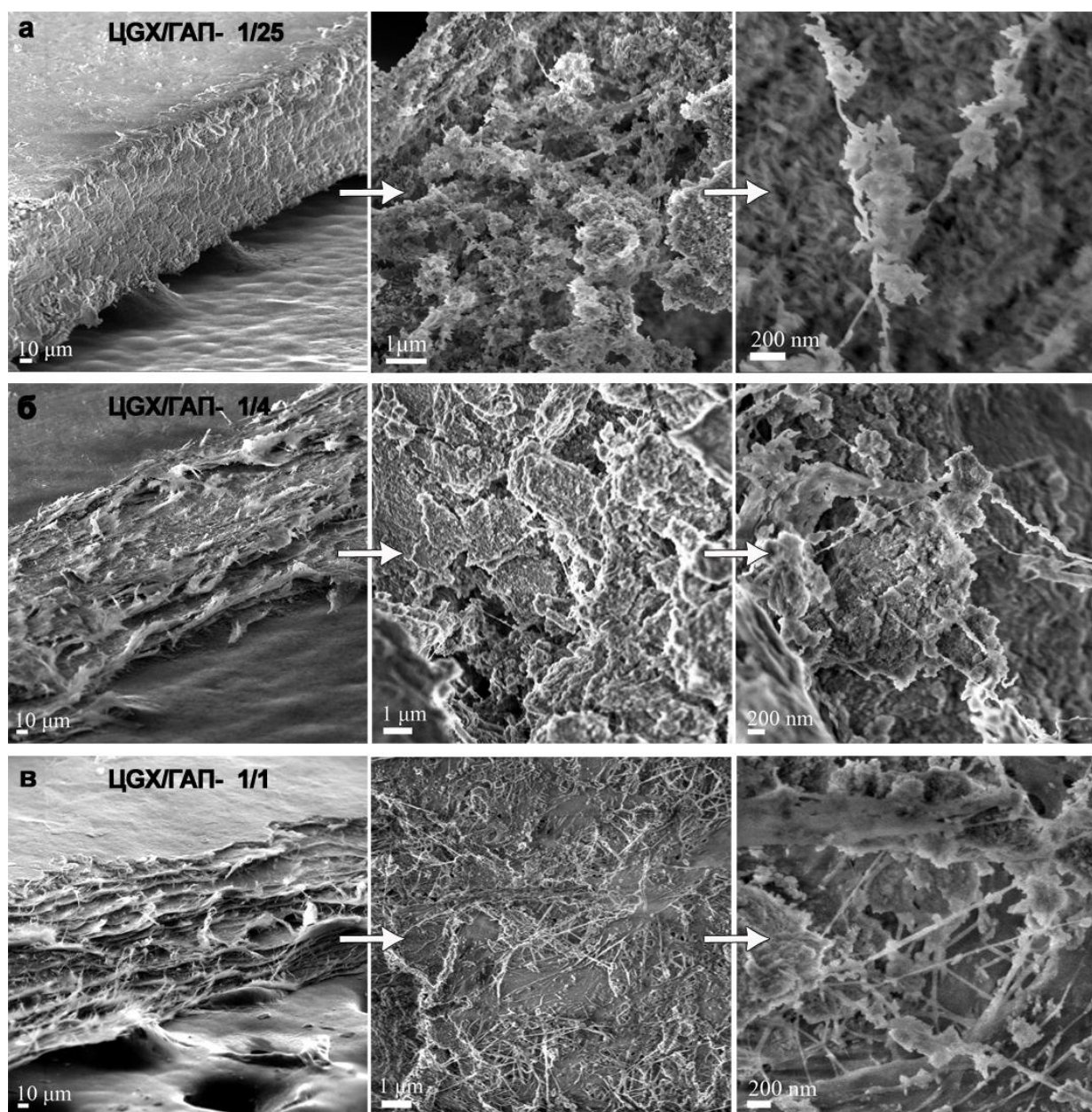


Рис.5.2. СЭМ изображения боковых сколов пленок ЦГХ/ГАП и их внутренней структуры при увеличении массовой доли бактериальной целлюлозы в композитах, полученных механическим смешиванием с разными массовыми соотношениями компонентов: ЦГХ/ГАП – 1/25 (а), 1/4– (б), 1/1- (в).

Дифрактограммы композитных пленок, полученных совместным агрегированием исходных компонентов при разных соотношениях ЦГХ/ГАП = 1/25 и 1/1, представлены на Рисунке 5.3.

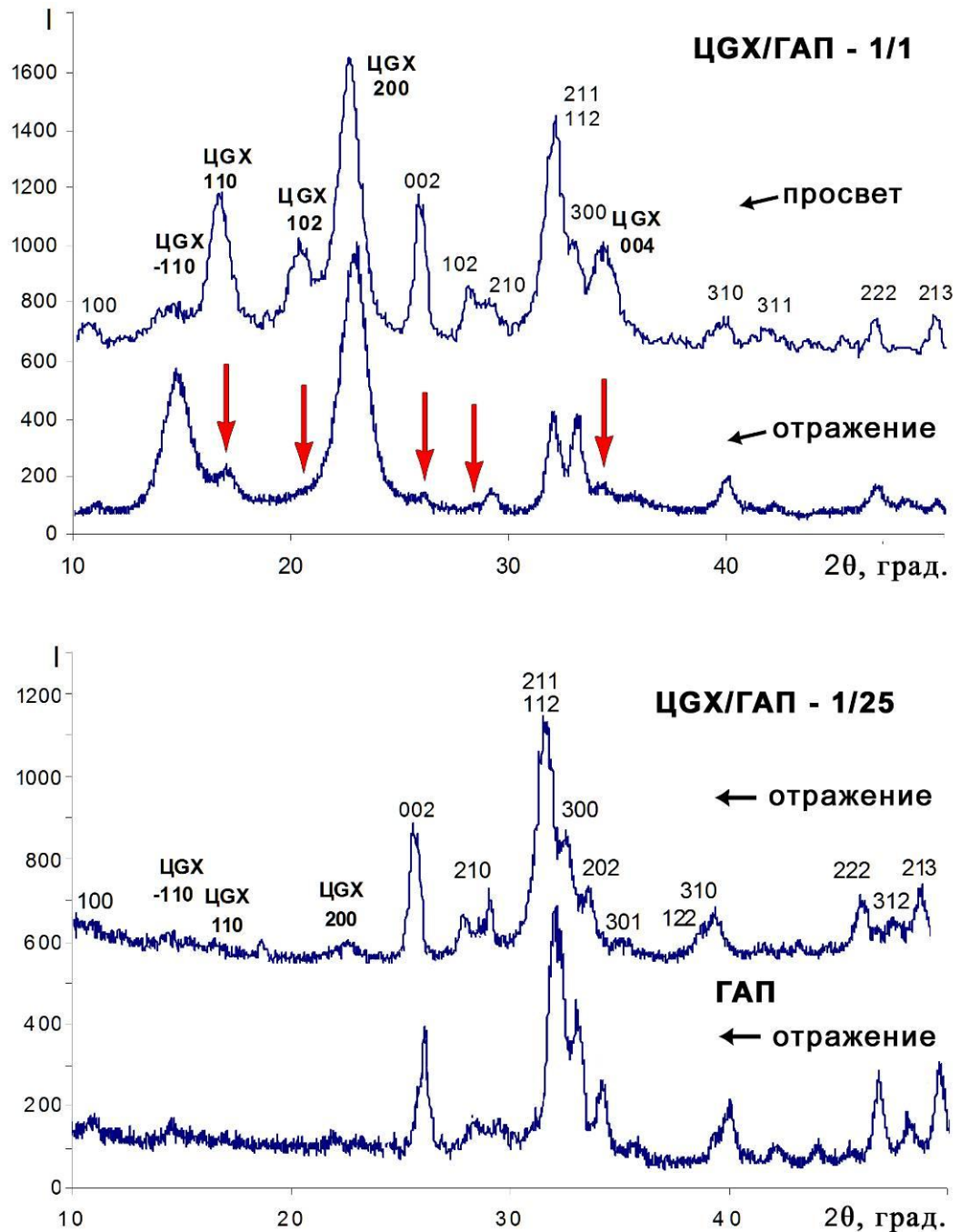


Рис.5.3. Дифрактограммы композитов, полученных совместным агрегированием суспензий ЦГХ и ГАП при соотношении компонентов 1/1 и 1/25, снятые при прохождении и отражении рентгеновского луча относительно поверхности пленки ЦГХ.

Видно, что для образца ЦГХ/ГАП = 1/1 дифракционная картина, снятая на просвет, значительно отличается от дифрактограммы на отражение. Изменение интенсивности рефлексов -110, 110 и 004 моноклинной ячейки ЦГХ ($P2_1$, $a=0.801$, $b=0.817$, $c=1.04$ нм, $\gamma=83^\circ$) в области углов $2\theta=10-50^\circ$ свидетельствует о преимущественной ориентации нанофибриллярных лент параллельно поверхности образца. Рефлекс целлюлозы 004 ($2\theta = 35^\circ$), характеризующий периодичность полимерной цепи ЦГХ, исчезает при съемке на отражение, а рефлексы от гексагонального гидроксиапатита ($P6_3/m$, $a=0.94$, $c=0.68$ нм) в области углов отражения $2\theta = 25 - 50^\circ$ заметно изменяют свою интенсивность при переходе от одного способа съемки к другому (рефлекс ГАП 002 ($2\theta = 26^\circ$), обладающий значительной интенсивностью, а также рефлексы 102 ($2\theta = 28.3^\circ$), 112 ($2\theta = 32.4^\circ$) и 004 ($2\theta = 53.1^\circ$) практически исчезают при съемке на отражение). Такие изменения на дифрактограммах могут быть связаны с закономерной ориентацией пластинчатых кристаллов гидроксиапатита на плоскостях (-110) микрофибриллярных лент целлюлозы, способствующих преимущественному расположению кристаллов ГАП вдоль оси с. Следует отметить, что в композите с большей массовой долей гидроксиапатита ЦГХ/ГАП=1/25 дифрактограмма на отражение практически не отличается от дифрактограммы на просвет и практически идентична дифрактограмме, полученной для чистого ГАП. Последний факт может быть связан с малым количеством органической составляющей, что приводит к ограничению сорбирования ГАП на фибриллы ЦГХ.

Полученные результаты рентгеновских исследований подтверждаются данными просвечивающей электронной микроскопии. На Рисунке 5.4. приведены изображения фибриллы/волокна бактериальной целлюлозы с агломератами нанокристаллов ГАП. Из геометрического анализа электронограммы (а) и распределения интенсивности вдоль колец следует, что наночастицы гидроксиапатита располагаются на фибриллах ЦГХ преимущественно осью с параллельно поверхности фибрилл бактериальной целлюлозы. Однако при увеличении массовой доли ГАП в композите текстура нанокристаллов ГАП

относительно лент/фибрилл ЦГХ не всегда имеет место. На Рисунке 5.4.б представлено изображение волокна ЦГХ с агломератом ГАП. При увеличении размера агломерата постепенно меняется геометрия дифракционной картины и четко выраженная текстура исчезает. На фрагменты ЦГХ осаждаются или агломерат из наночастиц или первично осажденные нанокристаллы ГАП становятся центрами дальнейшей хаотичной агрегации нанокристаллов, что, по-видимому, и объясняет факт отсутствия текстуры ГАП на рентгеновской дифрактограмме на отражение для композита с большим содержанием ГАП.

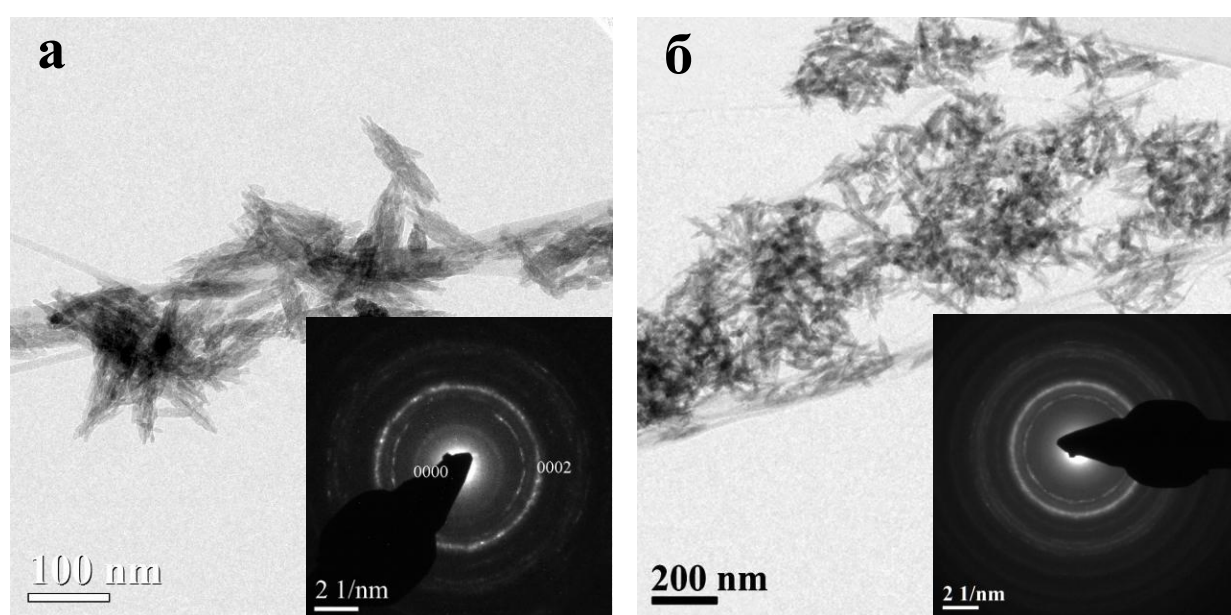


Рис. 5.4. ПЭМ изображения фибрилл бактериальной целлюлозы с агломератами наночастиц ГАП в композитах ЦГХ/ГАП -1/1 (а), ЦГХ/ГАП- 1/25 (б), полученных агрегированием суспензий ЦГХ и ГАП, соответствующие картины электронной дифракции от агломератов ГАП.

5.2.2. Композиты, полученные при проведении синтеза нанокристаллов ГАП в присутствии фрагментов ЦГХ

Изображения боковых сколов композитных пленок ЦГХ/ГАП с разными массовыми соотношениями представлены на Рис. 5.5. Данные СЭМ для данных пленок аналогичны данным о композитных пленках ЦГХ/ГАП, полученных

первым способом: при увеличении доли ЦГХ в композите структура боковых поверхностей становится подобной структуре исходной раздробленной ЦГХ, агломераты наночастиц ГАП располагаются на фибриллах ЦГХ неравномерно.

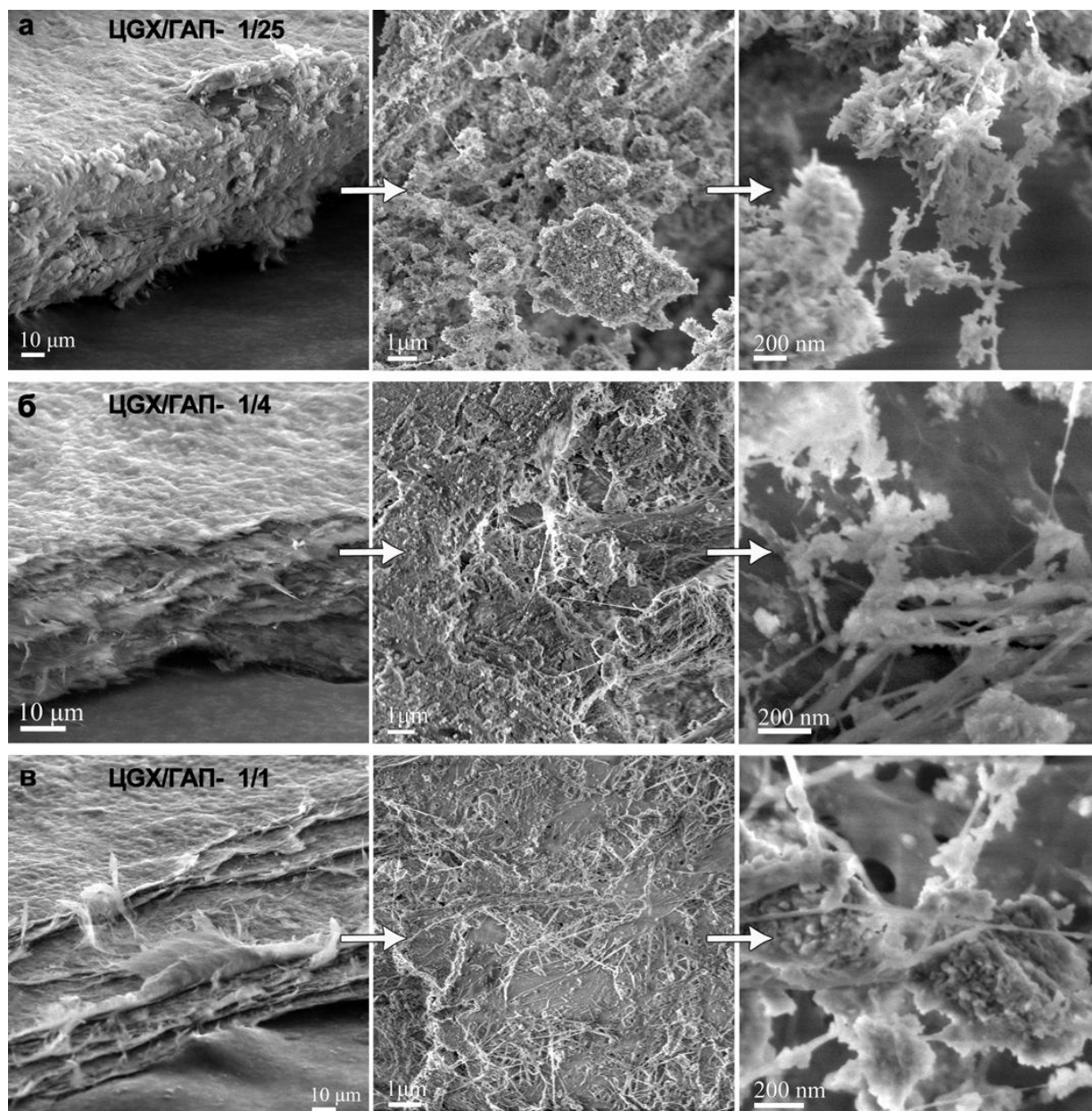


Рис.5.5. СЭМ-изображения боковых сколов пленок ЦГХ/ГАП и их внутренней структуры при увеличении массовой доли бактериальной целлюлозы в композитах, полученных при синтезе ГАП в среде ЦГХ с разными массовыми соотношениями компонентов: ЦГХ/ГАП – 1/25 (а), 1/4– (б), 1/1- (в).

Диффрактограммы композитов ЦГХ/ГАП, полученных при синтезе гидроксиапатита в среде диспергированной бактериальной целлюлозы, представлены на Рисунке 5.6. Видно, что для композита с массовой долей ЦГХ/ГАП= 1/25 преимущественной ориентации нанокристаллов ГАП не наблюдается. Соотношения интенсивностей рефлексов ГАП в композите и отдельно синтезированного ГАП практически идентичны, рефлексы от ЦГХ на диффрактограмме от композита практически отсутствуют.

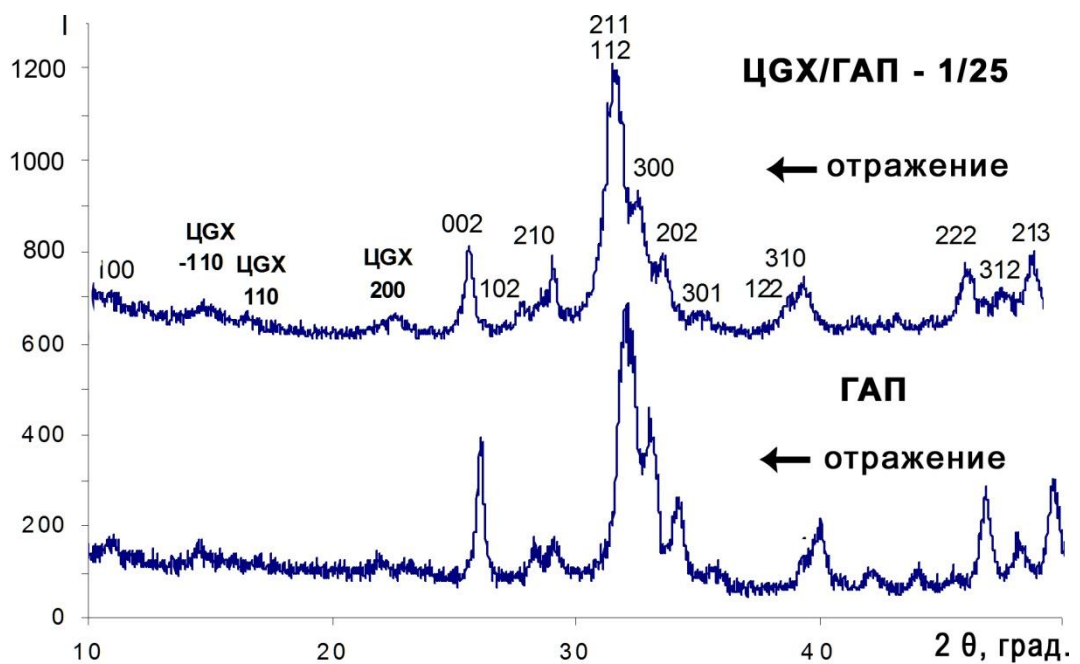


Рис. 5.6. Диффрактограммы, снятые на отражение композита ЦГХ/ГАП – 1/25, полученного в процессе синтеза гидроксиапатита в среде диспергированной целлюлозы ЦГХ и гидроксиапатита синтезированного таким же методом в отсутствии диспергированной ЦГХ.

Изображения агрегатов нанокристаллов ГАП на фибриллах БЦ представлены на Рисунке 5.7 (а, б, в). На картинах электронной дифракции от выделенной области, полученной от агрегата ГАП на отдельной фибрилле ВС, присутствует текстура с углом ориентации $\pm 2-7^\circ$ вдоль направления [0001]. Уширение диффузных колец на дифракционных картинах связано с проявлением

размерного эффекта [118] и свидетельствует об уменьшении размеров нанокристаллов ГАП с увеличением массовой доли ЦГХ в композите.

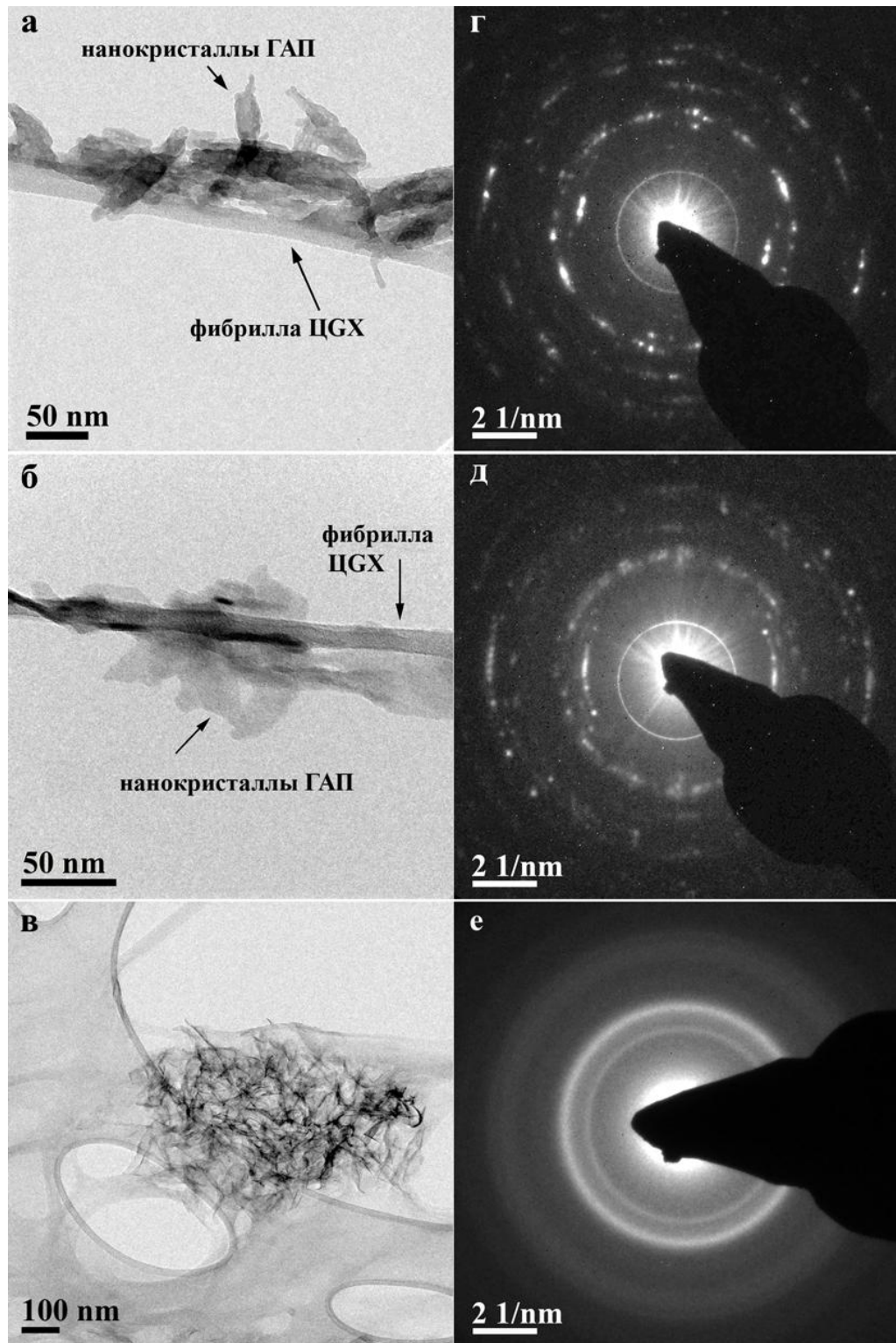


Рис.5.7. ПЭМ изображения композитов ЦГХ/ГАП с соотношениями: 1/25 - (а), 1/4 - (б), 1/1 - (в) и соответствующие картины электронной дифракции (г, д, е). Образец ЦГХ/ГАП- 1/1 расположен на углеродной подложке.

Для того чтобы оценить линейные размеры нанокристаллов вдоль направления [0001] были получены темнопольные изображения в рефлексе 0002 (Рис.5.8).

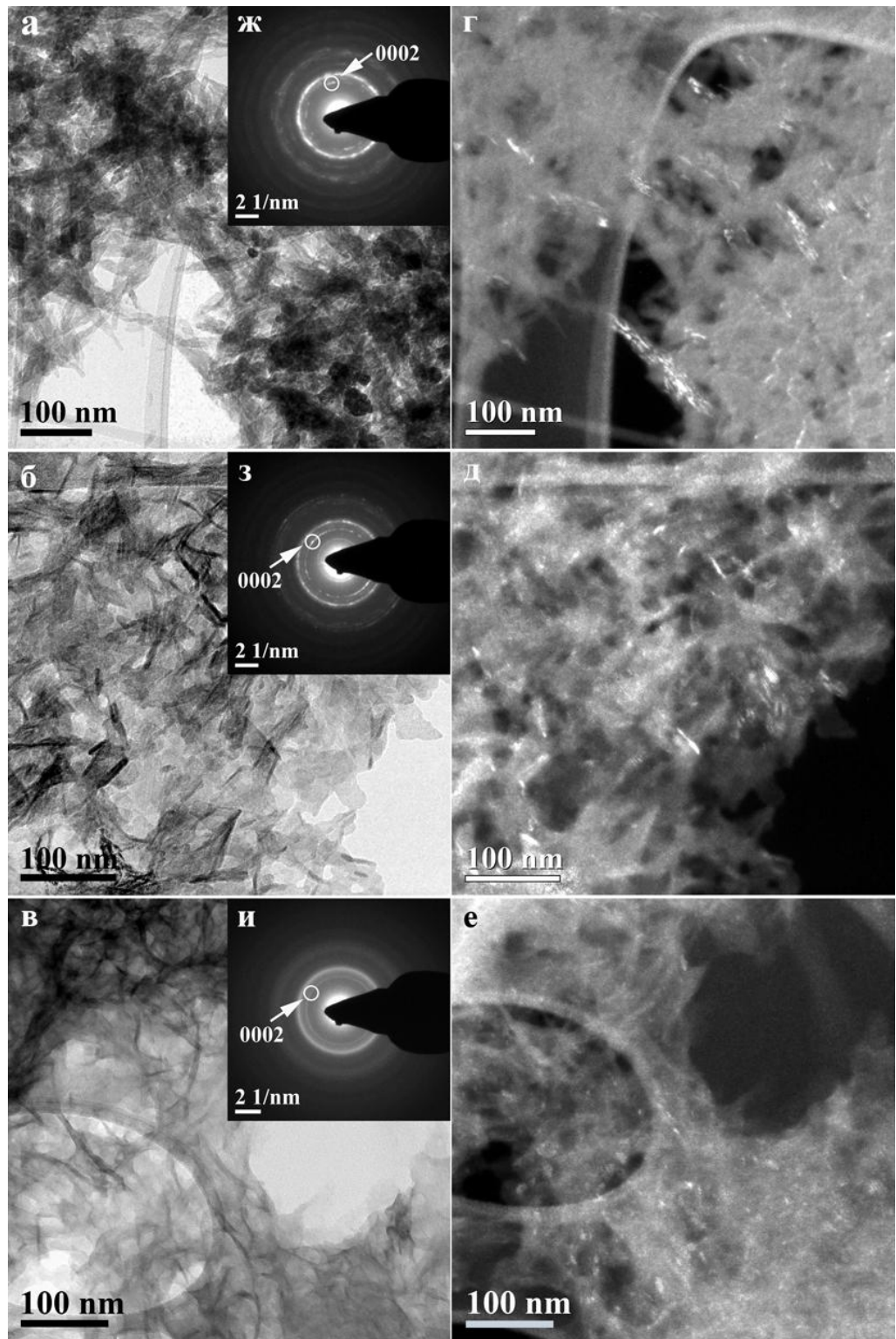


Рис.5.8.ПЭМ-изображения композитов ЦГХ/ГАП с соотношениями компонентов: 1/25 - (а), 1/ - (б), 1/1 - (в) и соответствующие темнопольные изображения (г, д, е), полученные в рефлексе 0002.

Для проведения статистического анализа определялись размеры нескольких сотен нанокристаллов. В образцах ЦГХ/ГАП с массовыми соотношениями компонентов 1/25 и 1/4 размер нанокристаллов не превышает 30 нм, в образце БЦ/ГАП 1/1 кристаллы размером менее 15 нм. Такие размеры кристаллов близки к размерам кристаллов ГАП в костной ткани [183, 184] и в композитах, полученных другими методами [153, 154]. Согласно результатам компьютерного моделирования процесса биоминерализации, ионы Ca^{2+} , PO_4^{-3} , OH^- не взаимодействуют с поверхностью фибрилл ЦГХ, а образуют ионные кластеры с последующим образованием кристаллов ФК их нуклеацией в растворе [185, 186]. Следовательно, в данном случае скорее имеет место осаждение уже образовавшихся в растворе нанокристаллов ГАП на фибриллы ЦГХ, а уменьшение размера кристаллов ГАП при увеличении массовой доли ЦГХ в композите может быть связано как с уменьшением диффузии ионов Са и Р, что препятствует осуществлению химической реакции, так и с образованием пресыщения в растворе, что приводит к образованию маленьких кристаллов.

Толщина нанокристаллов ГАП была оценена с помощью метода ВРЭМ моделирования. Для этого были получены ВРЭМ-изображения от отдельно лежащих нанокристаллов ГАП, ориентированных вдоль направления [2-1-10] относительно падающего электронного пучка. После чего в программе JEMS было проведено моделирование ВРЭМ изображений для выбранного направления в зависимости от величины дефокуса и значения толщины кристалла и проведены сравнения с экспериментально полученными изображениями для установления наилучшего соответствия.

ВРЭМ изображение большого кристалла ГАП в композите ЦГХ/ГАП – 1/25 вдоль направления [2-1-10], расположенного на краю агломерата, представлено на Рис.5.9.

Серии моделированных ВРЭМ изображений были рассчитаны по методу блоховских волн при варьировании толщины от 0.812 нм до 8.12 нм (от одной до 10 параметров элементарной ячейки в направлении [2-1-10]) и значении дефокуса от 30-65 нм и представлены на Рисунке 5.10.

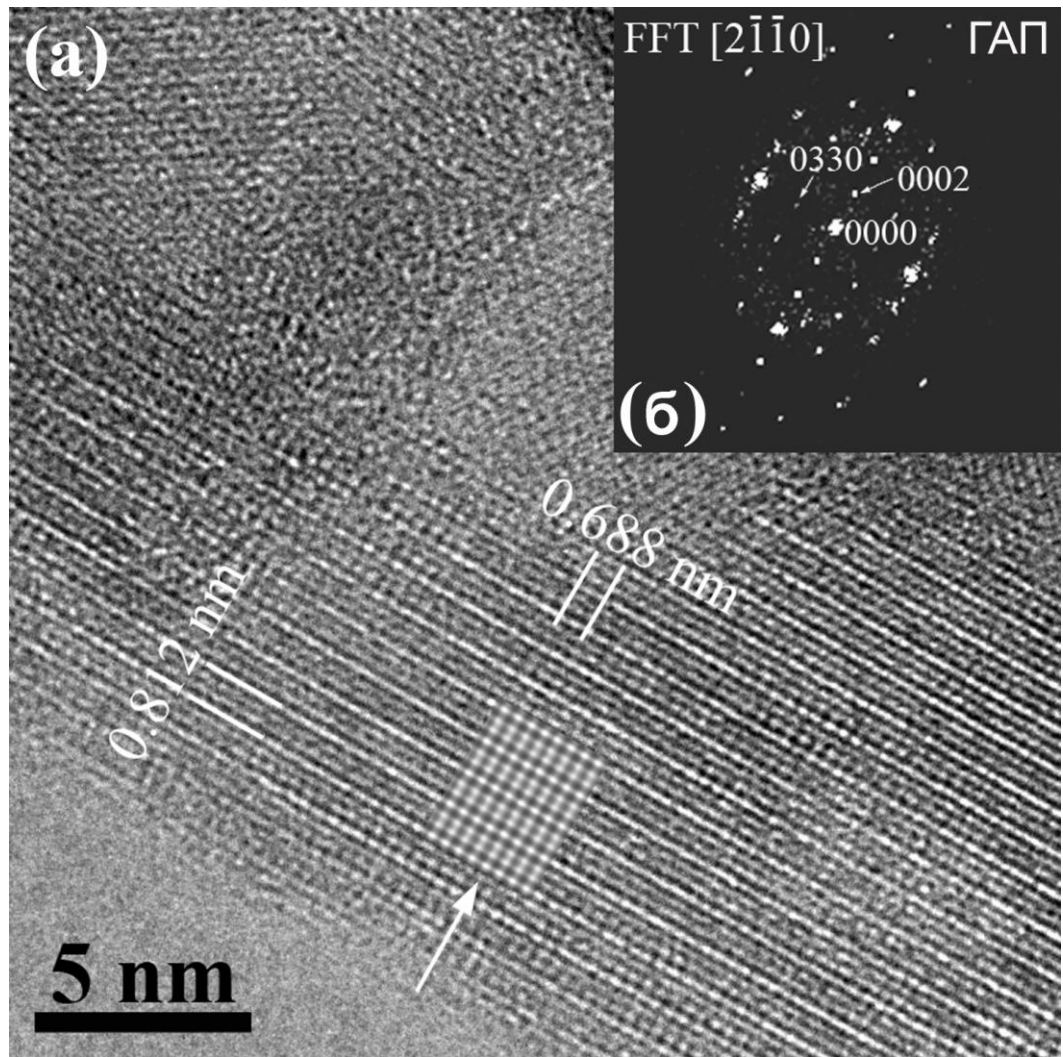
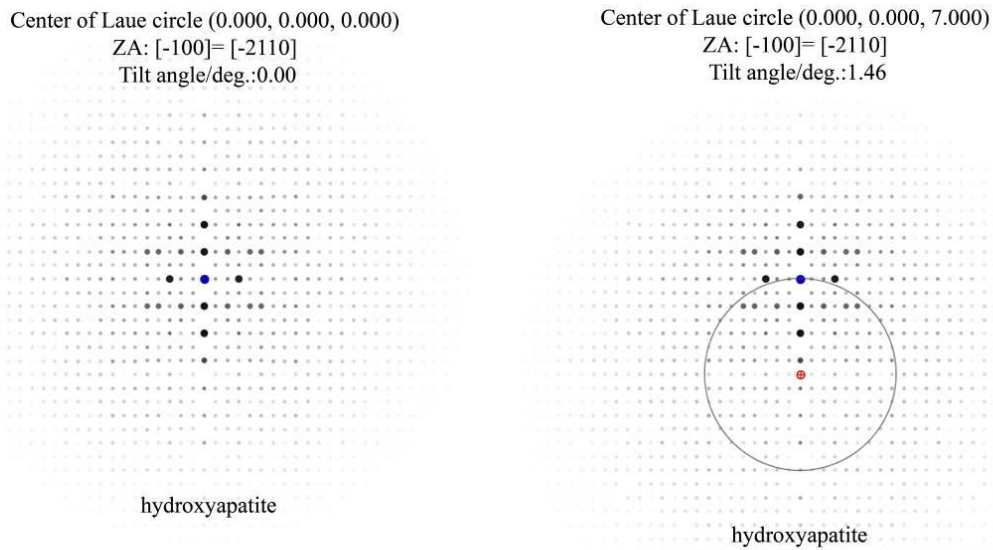


Рис.5.9. ВРЭМ-изображение нанокристалла ГАП в композите ЦГХ/ГАП - 1/25, полученное вдоль направления $[2-1-10]$ (а) и дифрактограмма от него (б). Соответствующее моделированное ВРЭМ изображение указано на вставке белой стрелкой.

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



параметры толщина, нм	[-2110] CLC(000), x=y=0	наклон от[-2110] на угол 1.46 CLC(00-7), x=y=0	наклон от[-2110] на угол 1.46 CLC(00-7), x=y=0.07
8.1 (10 ячеек)			
7.3 (9 ячеек)			
6.5 (8 ячеек)			
5.7 (7 ячеек)			
4.9 (6 ячеек)			
4.0 (5 ячеек)			
3.3 (4 ячейки)			
2.5 (3 ячейки)			
1.6 (2 ячейки)			
0.812 (1 ячейка)			
дефокус	30 40 50 60 70	30 40 50 60 70	30 40 50 60 70

Рис.5.10.Серия моделированных ВРЭМ изображений для нанокристалла НАР с осью зоны [-2110] в зависимости от толщины t (0.812 – 8.1 нм) и величины дефокуса d (30 -70 нм) в точной ориентации оси зоны [-2110] (без учета наклона кристалла) -1 столбец, с учетом наклона нанокристалла на угол 1.46° к оси зоны [-2110] – 2 столбец, с учетом наклона образца на угол 1.16° [-2110] и с учетом осевых амплитуд вибраций $x=y=0.07$ нм – 3 столбец.

Проведение ВРЭМ моделирования для нанокристаллов ГАП вдоль направления [2-1-10] в композитах с другими массовыми соотношениями показало, что толщина нанокристаллов ГАП не изменяется и составляет приблизительно 4 нм, что коррелирует с данными о толщине нанокристаллов в костной ткани от 2 до 10 нм [183, 184].

Данные о размерах нанокристаллов ГАП, синтезированных в присутствии фрагментов ЦГХ при разном соотношении компонентов, представлены в Таблице 5.1.

Таблица.5.1. Размеры нанокристаллов ГАП в композитах с разным соотношением компонентов.

ЦГХ-ГАП	Длина, нм	Средняя длина, нм	Толщина, нм
ЦГХ-25ГАП	1.5-30 (± 0.3)	9.0	<5
ЦГХ-4ГАП	1.5-30 (± 0.3)	7.2	<5
ЦГХ-ГАП	1.5-15 (± 0.3)	5.5	<4

5.2.3. Композиты, полученные при проведении синтеза ЦГХ в присутствии ГАП

Изображения поверхности композитов, полученных при введении водной суспензии ГАП в питательную среду при синтезе ЦГХ, представлены на Рисунке 5.11. Можно отметить, что нанокристаллы ГАП не удаляются из композита после отмывания гель-пленки от бактериальных клеток посредством кипячения в растворе щелочи. При большой концентрации ГАП в среде видно, что агломераты ГАП пронизаны фибриллами ЦГХ (Рис.5.11 а). При небольшой массовой доле ГАП в питательном растворе боковая поверхность образованной гель-пленки (Рис.5.11 в) подобна поверхности исходной тестурированной нано-гель-пленке ЦГХ (Рис. 3.14 а).

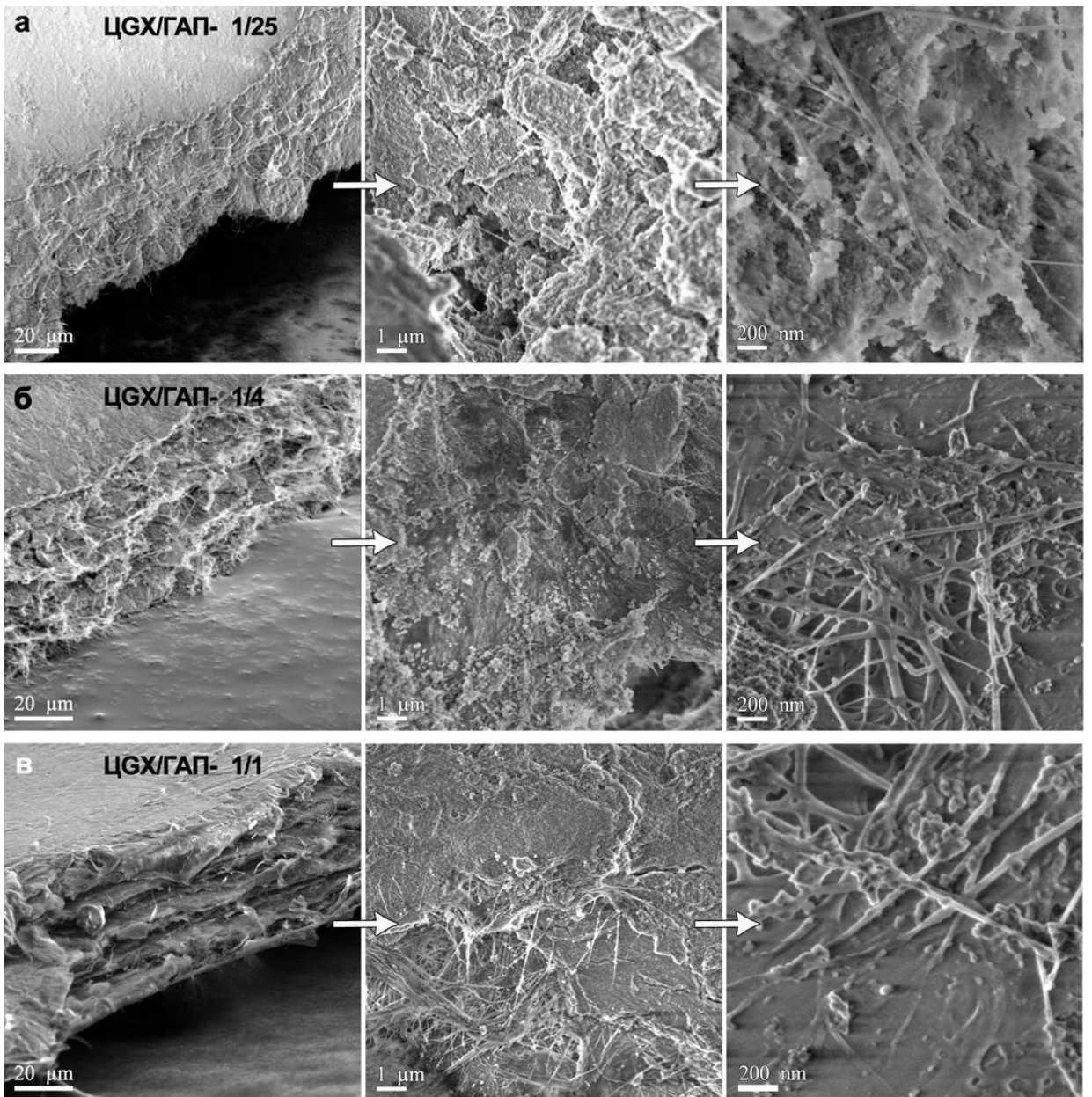


Рис.5.11. СЭМ изображения внутренней структуры при увеличении массовой доли бактериальной целлюлозы в композитах, полученных при синтезе ЦГХ в питательной среде, содержащей ГАП с разными массовыми соотношениями компонентов: ЦГХ/ГАП – 1/25 (а), 1/4– (б), 1/1- (в).

Анализ рентгеновских дифракционных картин полученных от композитных пленок с соотношением ЦГХ/ГАП – 1/1 показывает наличие текстурированной гидроксиапатитной составляющей (Рис.5.12). Видно, что происходит перераспределение соотношения интенсивностей рефлексов гидроксиапатита 002, 102, 112 на дифрактограмме в зависимости от способа съемки аналогично

результатам, полученным для композита ЦГХ/ГАП – 1/1 в первом случае (Рис.5.3). При съемке на прохождение проявляется рефлекс от ЦГХ 110 в области $2\theta = 17^\circ$, который исчезает, как и рефлексы 102 и 004, на дифрактограмме, полученной на отражение. Важно отметить, что рефлексы принадлежащие ГАП имеют слабую интенсивность по сравнению с рефлексами ЦГХ и в процессе такого биосинтеза формируется традиционная текстурированная гель-пленка ЦГХ.

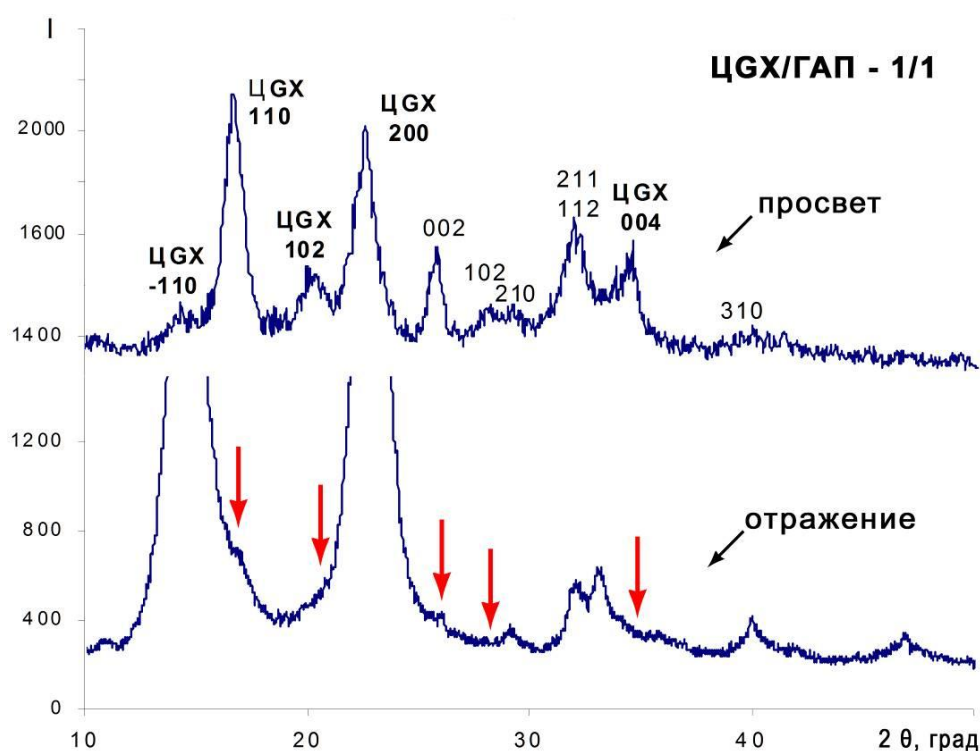


Рис.5.12. Дифрактограммы, снятые при прохождении и отражении рентгеновского пучка относительно поверхности пленки композитов, полученных при введении суспензии ГАП в питательную среду биосинтеза целлюлозы.

На картинах электронной дифракции, полученных в электронном микроскопе от наночастиц ГАП на поверхности фибриллы ЦГХ видно, что при большой концентрации наночастиц ГАП в растворе имеет место их хаотичная агрегация как с образовавшимися волокнами ЦГХ, так и друг с другом, что приводит к исчезновению преимущественной ориентации нанокристаллов относительно волокон. При малой концентрации ГАП в среде происходит преимущественная ориентация нанокристаллов относительно лент целлюлозы (Рис.5.13).

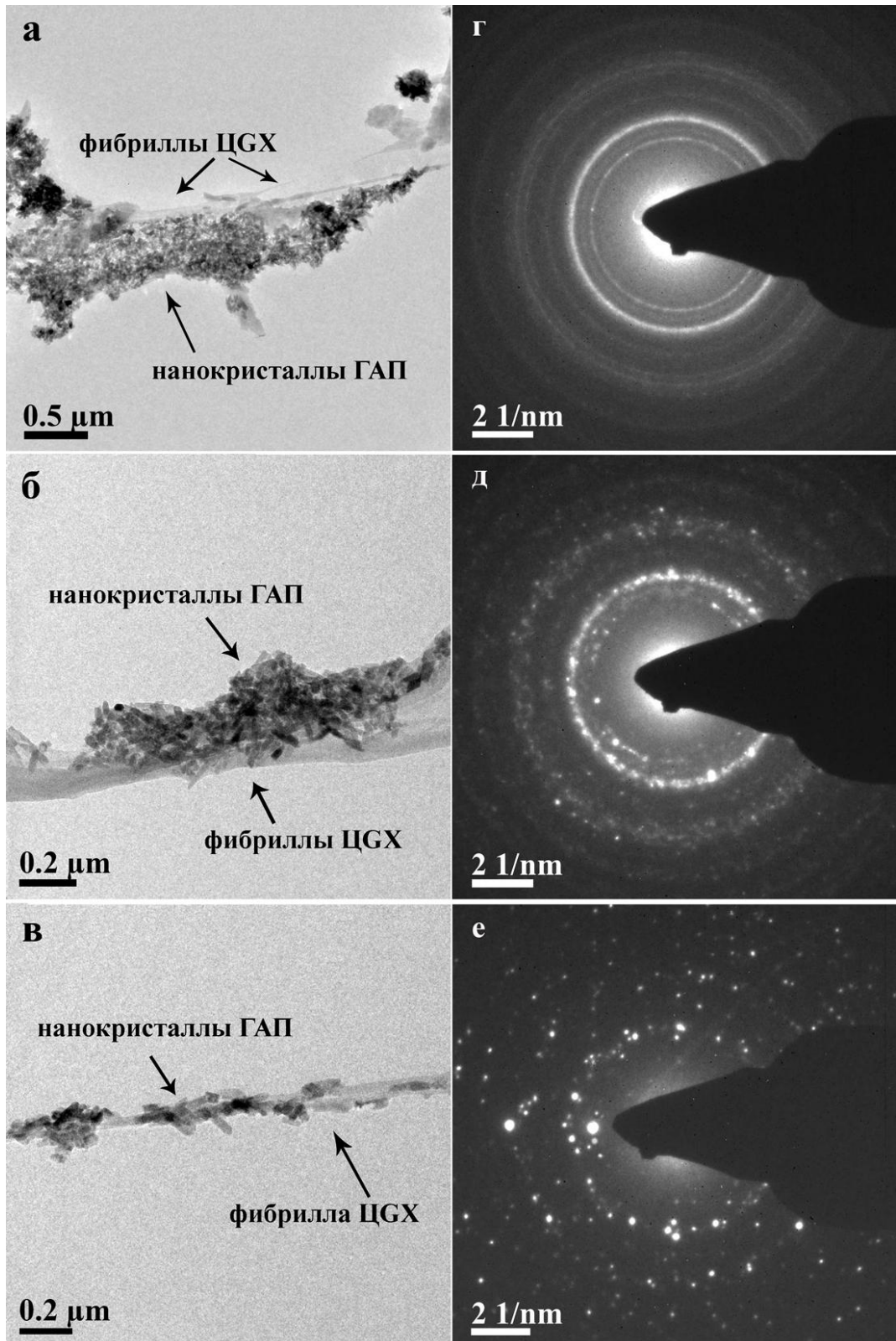


Рис.5.13. ПЭМ изображения композитов БЦ/ГАП с разными массовыми соотношениями – 1/25 (а), 1/4 (б), 1/1 (в) и соответствующие картины электронной дифракции (г, д, е).

Для того чтобы определить влияние последующей очистки композита от питательной среды на форму и структуру наночастиц ГАП, были получены темнопольные изображения в рефлексе 0002 (Рис.5.14). По серии темнопольных изображений были определены линейные размеры нанокристаллов ГАП вдоль направления $[0001]$, которые составили от 5 до 110 нм.

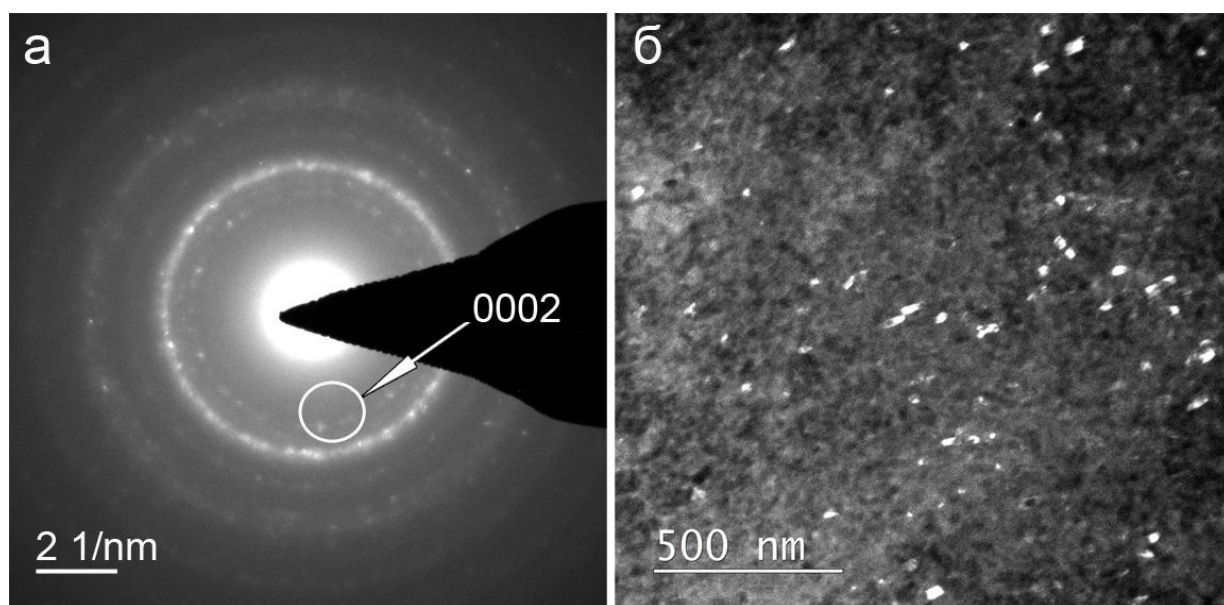


Рис.5.14. Дифракционная картина от нанокристаллов ГАП в композите, полученном при синтезе ЦГХ при введении ГАП в питательную среду – (а), и соответствующее темнопольное изображение в рефлексе 0002 – (б).

ВРЭМ изображение нанокристаллов ГАП в композите ЦГХ/ГАП 1/4 представлено на Рис.5.15. Проведение ВРЭМ моделирования для нанокристаллов ГАП вдоль направления $[2-1-10]$ в композитах показало, что толщина нанокристаллов не изменяется и составляет приблизительно 5 нм. Полученные размеры нанокристаллов коррелируют с размерами исходных синтезированных ГАП, что доказывает факт неизменности их структуры после последовательных обработок в щелочной среде.

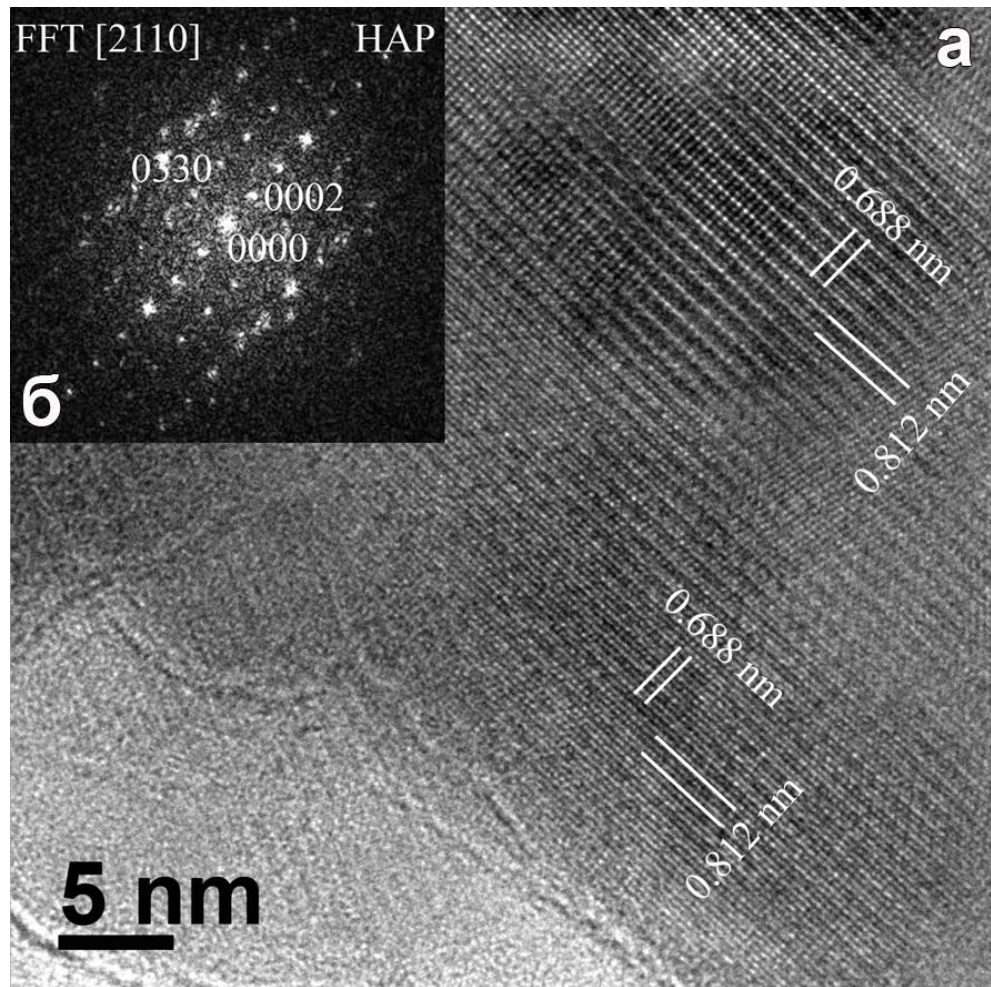


Рис.5.15. ВРЭМ-изображение нанокристалла ГАП в композите ЦГХ/ГАП - 1/25, полученное вдоль направления $[2-1-10]$ (а) и соответствующая дифрактограмма (б).

5.3. Свойства композитов ЦГХ и нанокристаллов ГАП, полученных разными методами

Физико-химические характеристики композитных пленок ЦГХ/ГАП представлены в Таблице 5.2. Видно, что для серий образцов ЦГХ/ГАП, полученных разными методами, вплоть до отношения ЦГХ/ГАП=1 наблюдается разнонаправленная тенденция изменения удельной поверхности. Для композитов, полученных физическим смешением ЦГХ и ГАП, увеличение доли гидроксиапатита в композите приводит к увеличению удельной поверхности и объема пор.

Таблица 5.2. Физико-химические свойства композитных пленок ЦГХ/ГАП, полученных при совместном смешивании водных суспензий ЦГХ и ГАП – 1, при синтезе нанокристаллов ГАП в водной суспензии ЦГХ -2.

Композит ЦГХ/ГАП	Удельная пов-ть, м ² /г	Объем пор, см ³ /г	Средний размер нанопор , нм	Порис- тость, %	Плот- ность, г/см ³	Модуль Юнга/разр.п рочность, ГПа/МПа
ЦГХ/ГАП-1 4/96	77,4 ±3,7	0,47 ±0,07	9,6±0,7	58,9 ±2,7	1,25 ±0,07	-/-
ЦГХ/ГАП-1 20/80	68,8 ±2,5	0,43 ±0,06	11,9±1,0	52,8 ±2,3	1,23 ±0,07	4,9±0,7/ 77±14
ЦГХ/ГАП-1 50/50	55,1 ±2,1	0,33 ±0,07	10,4±1,1	40,7 ±1,9	1,23 ±0,07	8,0±0,5/ 134±14
ЦГХ/ГАП-1 70/30	11,0 ±1,0	0,039 ±0,06	8,3±0,5	6,7 ±0,7	1,7 ±0,08	7,5±0,7/ 136±15
ЦГХ дисперг.	7,5 ±0,5	0,015 ±0,07	1,1±0,01	2,3 ±0,05	1,54 ±0,09	8,5±0,2/ 176±44
ЦГХ/ГАП-2 4/96	56,3 ±3,0	0,27 ±0,06	10,5±1,1	44,8 ±1,5	1,6 ±0,09	3,2±0,1 /8±1
ЦГХ/ГАП-2 20/80	70,1 ±3,2	0,37 ±0,07	9,9±1,0	49,2 ±1,9	1,32 ±0,08	5,6±0,4/ 59±2
ЦГХ/ГАП-2 50/50	86,8 ±4,0	0,27 ±0,06	12,3±1,2	36,0 ±1,2	1,33 ±0,08	5,0±0,7/ 59±5
ЦГХ/ГАП-2 70/30	22,8 ±1,4	0,10 ±0,01	11,4±1,1	15,5 ±1,5	1,55 ±0,09	7,5±0,6/ 140±17
ЦГХ гель-пленка	7,4 ±0,5	0,001 ±0,0001	0,5±0,05	0,1 ±0,01	1,56 ±0,09	10,4±0,5/ 254±20

В то же время для образцов композитов, полученных путем синтеза ГАП в среде ЦГХ наблюдается обратная зависимость величин удельной поверхности. При этом общий объем пор колеблется возле значения $0,32 \pm 0,05 \text{ см}^3/\text{г}$ (Рис.5.16. а, б).

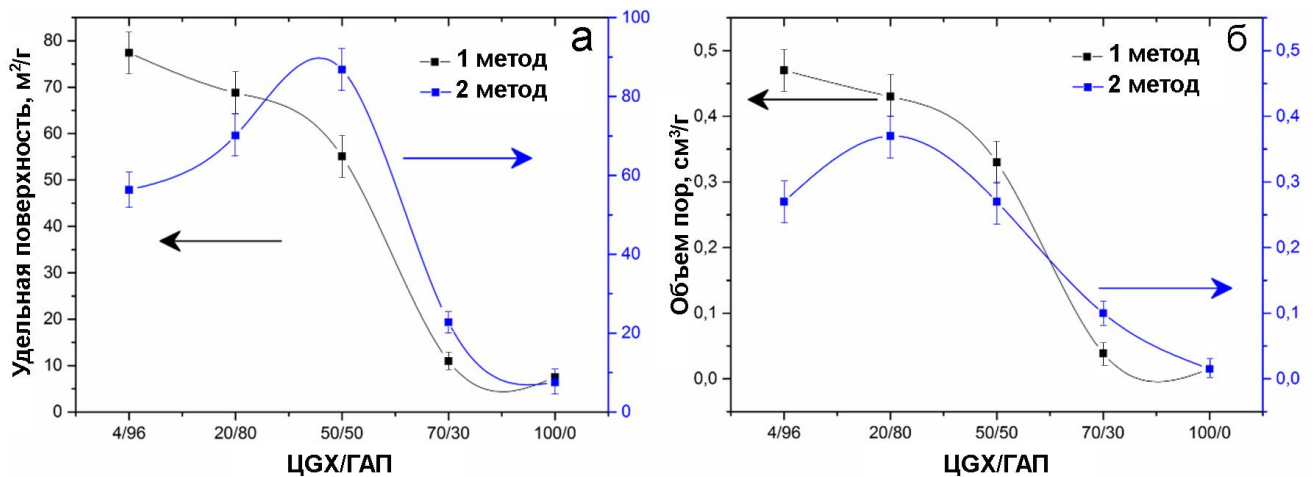


Рис.5.16. Зависимость удельной поверхности (а) и объема пор (б) от соотношения компонентов в композите и способа его приготовления.

Значение среднего размера нанопор практически не зависит от способа получения композита и соотношения компонентов в нем и составляет величину $10,4 \pm 2,0 \text{ нм}$, следовательно, изменение удельной поверхности связано с образованием различной микро- и макропористой текстуры композита. Причиной такого поведения экспериментальных образцов, по-видимому, является различие в механизме формирования текстуры композита при различных способах его получения. В случае физического смешения наночастицы ГАП и их агломераты просто адсорбируются (осаждаются) на фрагментах бактериальной целлюлозы в растворе. В том случае, когда гидроксиапатит синтезируется в среде ЦГХ, наночастицы, по всей вероятности, зарождаются как в растворе так и на фибриллах ЦГХ, ориентируясь своей плоской гранью параллельно плоскости фибриллы ЦГХ. Если целлюлозы в системе немного, то такая адсорбция не будет влиять на большинство образующихся в объеме кристаллов ГАП, однако частицы, формирующиеся на фрагментах целлюлозы будут выступать центрами агрегации с другими частицами. По мере увеличения содержания целлюлозы

количество нанокристаллов, зародившихся на волокнах ЦГХ, будет существенно возрастать, при этом наличие целлюлозных фрагментов в растворе мешает агломерации наночастиц. В связи с этим эффект раздвигания фибрилл остается, однако пространство между ними в процессе синтеза заполняется ГАП. Когда соотношение ЦГХ/ГАП составляет 70/30 (способ 2) реализуется смешанный механизм формирования композита. В этом случае начинает существенно влиять механизм образования текстуры, характерный для простых смесей ГАП-ЦГХ (способ 1), соответственно при увеличении доли ЦГХ падает как удельная поверхность, так и пористость.

Типичные кривые растяжения исследуемых композиционных материалов представлены на Рис.5.17. Деформационные зависимости приведены для композитов, полученных разными методами и с разным соотношением компонентов. Измельченная бактериальная целлюлоза демонстрирует как меньшую прочность, так и меньший модуль Юнга при большей деформируемости по сравнению с исходной гель-пленкой ЦГХ. Введение в бактериальную целлюлозу нанокристаллов ГАП приводит к существенному падению модуля Юнга и прочности. Тенденция к снижению основных механических параметров

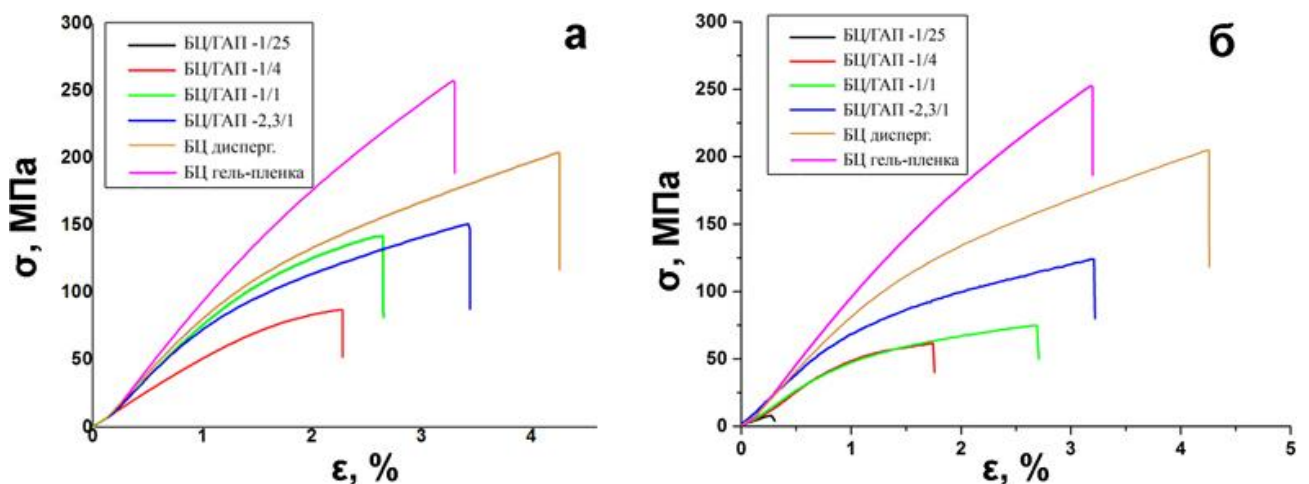


Рис.5.17. Кривые растяжения в координатах напряжение - деформация для композитов ЦГХ/ГАП с разным соотношением компонентов и полученных: смешением суспензий ЦГХ и ГАП - (а), путем синтеза гидроксиапатита в присутствии фибрилл бактериальной целлюлозы - (б).

не зависит от способа приготовления композита. Однако, существуют особенности в изменении механических характеристиках в зависимости от способа получения композитов.

Статистический разброс измеренных характеристик: модуля Юнга и разрывной прочности в зависимости от соотношения компонентов для разных способов получения представлены на Рис.5.18.

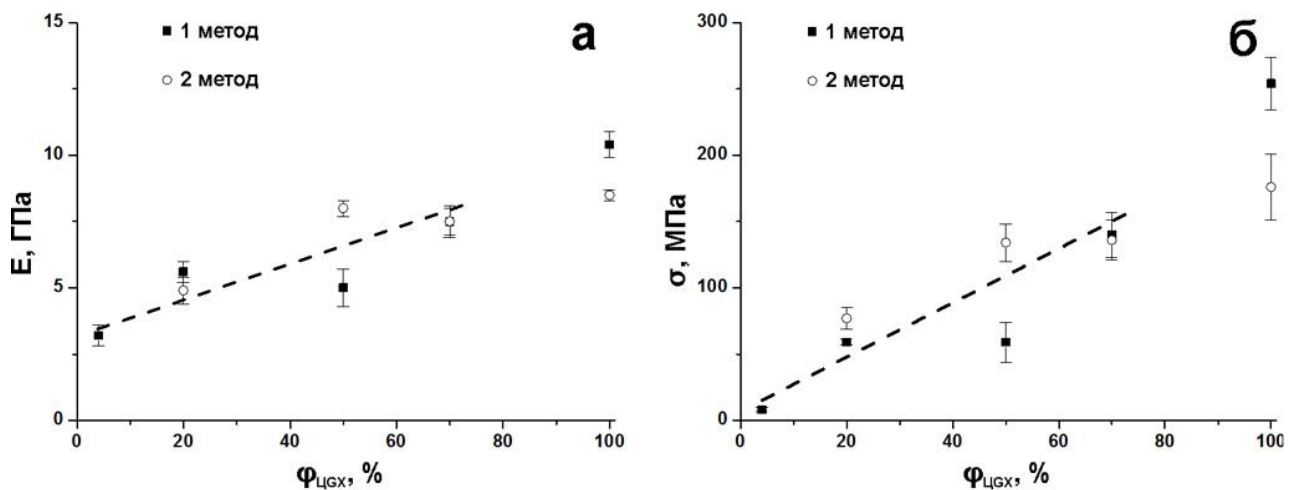


Рис.5.18. Зависимость модуля Юнга (а) и разрывной прочности (б) от массового соотношения целлюлозной составляющей в композите и способа получения композита.

Анализируя полученные значения модуля Юнга и прочности от содержания ЦГХ в композите можно сказать, что их изменение, с учетом имеющегося разброса в характеристиках, можно описать линейной зависимостью. Разброс является следствием неравномерности распределения наночастиц гидроксиапатита в композите, что было показано выше методом электронной микроскопии. Несмотря на то, что как показано на Рис.5.18 независимо от способа получения изменение механических характеристик может быть описано одной линейной зависимостью можно говорить о особенностях присущих каждому из способов получения. Как уже отмечалось выше, начальный уровень механических свойств определяется длиной фибрилл целлюлозы. При введении наполнителя, основное влияние оказывает способ введения частиц и присущее

ему их распределение по объему. Нами было показано, что при синтезе в ГАП в среде ЦГХ локальные концентрации на фибриллах могут существенно превосходить усредненную по массе концентрацию. Эти скопления при растяжении могут служить «концентраторами напряжения», приводящими к преждевременному снижению механических характеристик. В то же время в образцах, полученных методом смешения распределение частиц по объему равномернее. Все это выражается в следующем: у композитов, полученных смешением, характеристики слабо падают вплоть до соотношения 50/50, в то время как у образцов, полученных методом синтеза, существенное снижение параметров наблюдается при соотношении 70/30.

Следовательно, можно создать композит на основе слоев бактериальной целлюлозы и нанокристаллов гидроксиапатита с различными характеристиками. На рис.5.19. представлен образец смешанного композита ЦГХ/ГАП, состоящий из слоев с разным соотношением компонентов.

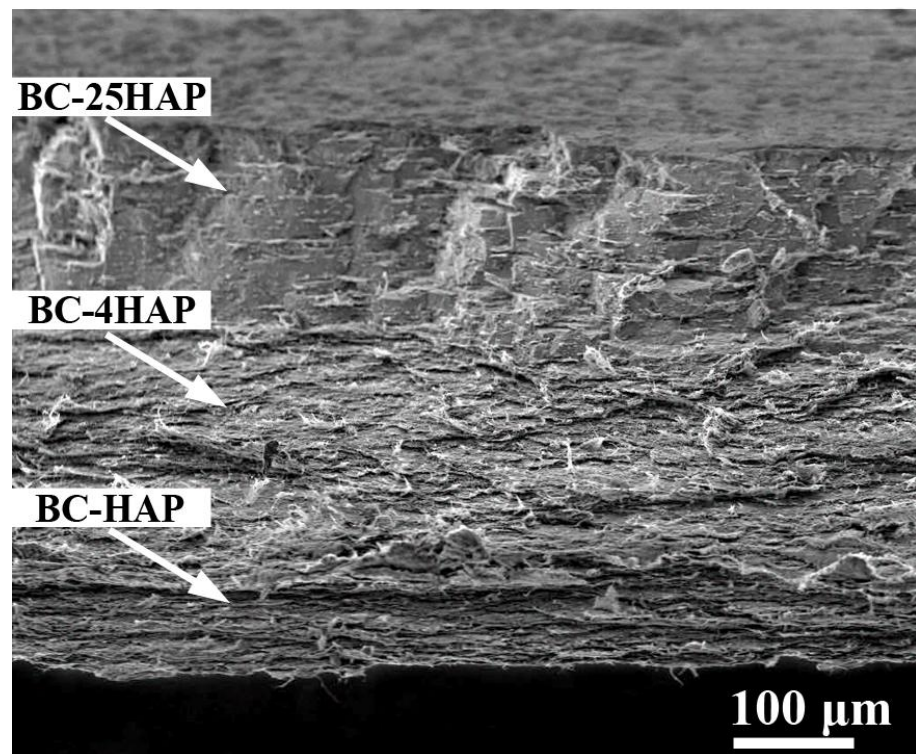


Рис.5.19. СЭМ изображение бокового скола композита ЦГХ/ГАП с разным соотношением компонентов (сверху вниз): слой ЦГХ/ГАП-1/25 (верх), ЦГХ/ГАП – 1/4 (середина), ЦГХ/ГАП -1/1 (низ).

Композиты ЦГХ/ГАП с соотношением компонентов 70/30, аналогичным известному соотношению коллагеновой и минеральной составляющих в естественной костной ткани, были приготовлены для сравнения характеристик полученных композитов с механическими свойствами костной ткани. Значения модуля упругости полученных пленок ЦГХ/ГАП при таком соотношении оказались близки к значениям модуля упругости для кортикальной костной ткани.

Известно, что характеристики (плотность, пористость, модуль Юнга) различных участков костной ткани могут существенно отличаться [187]. Предлагаемые нами способы получения композитного материала позволяют варьировать как пористость от 59 до 1 %, плотность от 1,23 до 1,7 г/см³, так и механические свойства, например, модуль Юнга от 3,2 до 7,5 ГПа в зависимости от способа получения композита и соотношения компонентов композита. На Рис. 5.20 представлена модель реконструкции костной ткани.

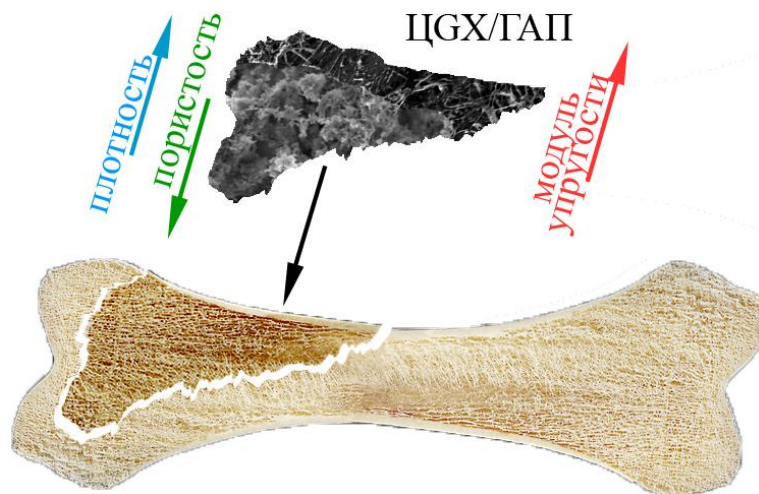


Рис.5.20. Модель реконструкции костной ткани с использованием композита, состоящего из слоев ЦГХ с разными массовыми соотношениями компонентов и разными свойствами.

Краткое обобщение результатов Главы 5

Поиск биоматериалов, обладающих характеристиками наиболее близкими к естественной костной ткани, привел исследователей к созданию имплантатов на

основе полимерных материалов с нанокристаллами гидроксиапатита. В данной работе изучалась структура и свойства композитов, где в качестве матрицы-полимера рассматривается целлюлоза *Glucosacetobacter xylinus*. Композиты на основе ЦГХ и нанокристаллов ГАП были получены тремя способами с варьированием соотношений компонентов: 1) механическим смешиванием водных суспензий ЦГХ и ГАП; 2) путем синтеза нанокристаллов ГАП в водной среде с добавлением суспензии ЦГХ; 3) путем синтеза ЦГХ в присутствии нанокристаллов ГАП в питательной среде.

Проведенные исследования показали, что нанокристаллы ГАП имеют преимущественную ориентацию направлением [0001] вдоль оси с фибрилл целлюлозы во всех композитах. Длина синтезированных наночастиц ГАП составляет от 5 до 100 нм, со средним размером 25 нм. Длина наночастиц в композитах, полученных при синтезе ГАП в среде фрагментов целлюлозы, уменьшается с увеличением массовой доли целлюлозы: средняя длина для композита ЦГХ/ГАП - 1/25 составляет 9 нм, для 1/4 - 7 нм, для 1/1 - 5,5 нм. Полученные результаты для длин нанокристаллов сопоставимы с размерами нанокристаллов ГАП в костной ткани. Установлено, что толщины нанокристаллов ГАП в композитах составляют менее 7 нм, что коррелирует с данными о толщинах наночастиц ГАП в костной ткани.

С помощью методов БЭТ, БДХ и проведением механических испытаний показано, что увеличение массовой доли целлюлозы в композите ЦГХ/ГАП приводит к увеличению плотности, прочности и уменьшению пористости независимо от способа получения композита. Таким образом варьирование способов получения и соотношения компонентов дает возможность получить широкий спектр материалов, обладающих управляемыми свойствами, для биомедицинского применения. Предложена модель реконструкции костной ткани с использованием композита на основе ЦГХ и нанокристаллов ГАП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выбор методов диагностики материалов всегда диктуется их характеристиками: структурой, размерами и свойствами, а также областью их применения.

Настоящая работа посвящена изучению морфологии и структуры нано-гель-пленки ЦГХ, а также композитов на основе ЦГХ с наночастицами металлов и неметаллов методами рентгеновской дифрактометрии, электронной дифракции и электронной микроскопии. Такой подход обусловлен возможностью получения общей (от нескольких мм до нескольких мкм) информации о структуре, морфологии и фазовом составе композитов на основе ЦГХ (сканирующая электронная микроскопия, рентгеновская дифрактометрия, электронная дифракция), а также данных о локальном строении (от нескольких микрон до атомного уровня): выявление особенностей взаимодействия нанопибрилл ЦГХ с отдельными нанокристаллами, определение размера и фазового состава наночастиц в композитах (просвечивающая электронная микроскопия).

Результаты проведенных исследований позволили:

- 1) определить наноструктурные особенности морфологии поверхностей исходной нано-гель-пленки ЦГХ, а также пленок, полученных из суспензии ЦГХ; особенности морфологии поверхности нано-гель-пленки ЦГХ с наноконплексами селена;
- 2) изучить характер проникновения наночастиц в архитектуру нано-гель-пленки;
- 3) установить структурные особенности композитов при одновременном введении наночастиц различной природы из растворов в матрицу ЦГХ, что позволило обнаружить кристаллизацию изначально аморфных наночастиц и образование новых по составу частиц;
- 4) показать, что нанокристаллы ГАП имеют преимущественную ориентацию на поверхности фибрилл целлюлозы аналогично ориентации

нанокристаллов ГАП на фибриллах коллагена в естественной костной ткани;

- 5) провести сравнительный анализ размеров нанокристаллов в композитах ЦГХ/ГАП с размерами нанокристаллов ГАП в костной ткани;
- 6) определить взаимосвязь между структурой и свойствами композитов на основе ЦГХ, полученных разными методами, что открывает возможность управлять физико-химическими характеристиками композитов от микро до наномасштаба.

ВЫВОДЫ

Результаты проведенных исследований можно сформулировать следующим образом:

- Определены наноструктурные особенности морфологии поверхностей исходной и дезинтегрированной нано-гель-пленки целлюлозы GX. Текстура, т.е. преимущественная ориентация микрофибрилл, присущая исходным пленкам на основе ЦГХ сохраняется и после ее дезинтегрирования. Проведена количественная оценка размеров пор на поверхностях нано-гель-пленки с целью получения исходных данных о матрице носителе до наполнения ее наночастицами.
- Показано, что в композите ЦГХ/нано-ПВП-Se распределение наночастиц на поверхностях и в глубине нано-гель-пленки полностью отвечает ее морфологическим особенностям.
- Выявлено, что при введении в нано-гель-пленку ЦГХ наночастиц из растворов, содержащих одновременно ионы Se и Ag, в матрице нано-гель-пленки ЦГХ образуются эллипсоидальные наночастицы, представляющие собой смесь кристаллитов селена (тригональная модификация) и селенида серебра (ромбическая модификация). На поверхности композита, в образцах с концентрациями ПВП-Se 1%, выявлены нанопроволоки тригонального селена длиной до нескольких микрон.
- Изучены особенности структуры композитов на основе ГАП/ЦГХ, сформированных тремя различными способами. Во всех случаях обнаружено явление закономерной адсорбции, в процессе которой ось с кристаллов ГАП ориентируется параллельно плоскости (-110) микрофибрилл ЦГХ. Установлено, что при увеличении массовой доли ЦГХ в растворе при синтезе ГАП в среде ЦГХ наблюдается уменьшение размеров наночастиц ГАП.

- Получена зависимость физико-химических характеристик композитов ЦГХ/ГАП от способа приготовления композита и соотношения компонентов, что позволяет целенаправленно управлять их свойствами.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЦ – бактериальная целлюлоза

ГАП – гидроксиапатит

ЦГХ – целлюлоза *Glucanacetobacter xylinus*

ВРЭМ – высокоразрешающая электронная микроскопия

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

ЭДС – энергодисперсионный спектральный анализ

ПВП – поливинилпирролидон

ПАМПС – поли(2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновая) кислота

ПВП-Se – наночастицы селена, стабилизированные поливинилпирролидоном

КГА – кальцийдефицитный гидроксиапатит

ФК – фосфат кальция

АФК – аморфный фосфат кальция

HV – ускоряющее напряжение

SB – напряжение, подаваемое на образец

k – коэффициент «иммерсии», равный отношению величины энергии первичного пучка к энергии падающего пучка электронов на образец

E_2 – энергия электронного пучка в СЭМ, при которой достигается баланс заряда на поверхности образца

$R_{\text{ЦГХ}}$ – глубина пробега электронов в нано-гель-пленке ЦГХ

Z_{Max} – максимальная глубина проникновения электронов

$Z_{\text{Max Backscattered}}$ – максимальная глубина проникновения электронов, которые способны покинуть образец

ЦГХ/ГАП – 1/25 – композит на основе ЦГХ и нанокристаллов гидроксиапатита с массовой долей ЦГХ/ГАП – 1/25

ЦГХ/ГАП – 1/4 – композит на основе ЦГХ и нанокристаллов гидроксиапатита с массовой долей ЦГХ/ГАП – 1/4

ЦГХ/ГАП – 1/1 – композит на основе ЦГХ и нанокристаллов гидроксиапатита с массовой долей ЦГХ/ГАП – 1/1

Автор выражает искреннюю признательность:

- научному руководителю Клечковской Вере Всеволодовне за профессиональные и ценные советы, полученные во время обучения и выполнения исследований, поддержку и понимание;
- Хрипунову Альберту Константиновичу, Баклагиной Юлии Георгиевне, Лукашевой Наталье Вячеславовне, Толмачеву Дмитрию Алексеевичу, Боровиковой Людмиле Николаевне и Валуевой Светлане Валерьевне – сотрудникам Института высокомолекулярных соединений РАН;
- Ткаченко Альбине Александровне – сотруднику Санкт – Петербургского государственного университета;
- Северину Александру Валерьевичу – сотруднику Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова;
- Васильеву Александру Леонидовичу – заведующему лабораторией электронной микроскопии НИЦ Курчатовского института;
- Крашенинникову Сергею Владимировичу – сотруднику лаборатории полимерных материалов НИЦ Курчатовского института;
- сотрудникам Института Кристаллографии им. А. В. Шубникова: лаборатории рефлектотрии и малоуглового рентгеновского рассеяния, сотрудникам лаборатории электронной микроскопии, а также сотрудникам лаборатории электронографии, которые повседневно терпеливо и внимательно участвовали в обсуждениях и написании данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kalia S., Dufresne A., Cherian B., Kaith B., Averous L, Njuguna J., Nassiopoulos E. Cellulose-based bio- and nanocomposites: a review// Int. J. Polym. Science. – 2011. - V. 2011. – P. 1-35.
2. Keshk S. Bacterial cellulose production and its industrial applications// J. Bioprocessing and Biotechniques. – 2014. – V.4. – P. 1-10.
3. Хрипунов А.К., Ткаченко А.А. Состав питательной среды культивирования *Acetobacter xylinum* для получения бактериальной целлюлозы. Патент РФ № 2189394. Оpubл. 20.09.2002.
4. Афиногенов Г.Е., Копейкин В.В., Панарин Е.Ф. Водорастворимая серебросодержащая бактерицидная композиция и способ ее получения. Патент РФ № 2128047.
5. Копейкин В.В., Валуева С.В., Киппер А.И., Боровикова Л.Н., Филиппов А.П. Синтез наночастиц селена в водных растворах поливинилпирролидона и морфологические характеристики образующихся нанокомпозитов// Высокомолек. соед. А. – 2003. – Т.45. – С. 615-622.
6. Хрипунов А.К., Ткаченко А.А., Баклагина Ю.Г., Боровикова Л.Н., Нилова В.К., Смыслов Р.Ю, Клечковская В.В., Матвеева Н.А., Волков А.Я., Лаврентьев В.К., Вылегжанина М.Э., Суханова Т.Е., Копейкин В.В. Формирование композита на основе наночастиц Se^0 , стабилизированных поливинилпирролидоном, и гелевых пленок целлюлозы *Acetobacter xylinum*//Ж. прикл. химии. – 2007. – Т.80. – С. 1516-1524.
7. Cady N.C., Behnke J.L., Strickland A.D. Copper-based Nanostructured coatings on natural cellulose:nanocomposites exhibiting rapid and efficient inhibition of a multy-drug resistant wound pathogen, *A.baumannii* and Mammalian Cell Biocompatibility in vitro// Adv. Funct. Mater.- 2011. – V. 21. – P. 2506-2514.
8. Wu J., Zheng Y., Song W., Luan J., Wen X., Wu Z., Chen X., Wang Q., Guo S. In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing// Carbohydr Polym. – 2014. – V.102. – P. 762-71.

9. Saska S., Barud H., Gaspar A., Marchetto R., Ribeiro S., Messaddeq Y. Bacterial Cellulose-Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone Regeneration// *Int. J. Biomat.* - 2011. - V. 2011. - P. 1-8.
10. Ahn S., Shin Y., Kim S., Jeong S., Jeong J., Park J., Gwon H., Seo D., Nho Y., Kang S., Kim C., Huh J., Lim Y. Characterization of hydroxyapatite-coated bacterial cellulose scaffold for bone tissue engineering// *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* – 2015. – V.20. – P. 948-955.
11. Pigossi S., de Oliveira G., Finoti L., Nepomuceno R., Spolidorio L., Rossa C., Ribeiro S., Saska S., Scarel-Caminaga R. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model// *J Biomed Mater Res A.* – 2015. – V.103. – P. 3397-406.
12. Буянов А.Л., Гофман И.В., Хрипунов А.К., Ткаченко А.А., Ушакова Е.Э. Высокопрочные биосовместимые гидрогели на основе полиакриламида и целлюлозы: синтез, механические свойства и перспективы применения в качестве искусственных заменителей хрящевых тканей. // *Высокомолекулярные соединения. Серия А.* – 2013. – Т.55. – С. 512.
13. Тагер А.А. Физико- химия полимеров// М.: Научный мир. – 2007. – С. 573.
14. Китайгородский А.И. Рентгеноструктурный анализ мелкокристаллических и аморфных тел// Гостехиздат. – 1952. – С. 589.
15. Аскадский А.А., Хохлов А.Р. // М.: Научный мир. – 2009. – С. 384.
16. Michler G.H. *Electron microscopy of polymers*// Springer. – 2008. – P. 473.
17. Вайнштейн Б.К. Структурная электронография// М.:Изд-во АН СССР. – 1956. –С. 314.
18. Вайнштейн Б.К. Дифракция рентгеновских лучей на цепных молекулах// М.:Изд-во АН СССР. – 1963 – С. 372.
19. Hosemann R., Bagchi S. *Direct analysis of diffraction matter*//Amsterdamm, the Netherlands: North-Holland. – 1962. – С. 734.

20. Manjunath B., Venkataraman A., Stephen T. The effect of moisture present in polymers on their X-ray diffraction patterns// J. of Applied Polymer Science. – 1973. – V. 17. – P. 1091-1099.
21. Баклагина Ю.Г., Хрипунов А.К., Ткаченко А.А., Гладченко С.В., Лаврентьев В.К., Волков А.Я., Нилова В.К., Денисов В.М., Суханова Т.Е., Занавескина И.С., Клечковская В.В. Фейгин Л.А. Исследование структурных параметров целлюлозы *Acetobacter xylinum* в процессе сушки гель-пленок // Журнал прикладной химии. – 2003. – Т.76. – С. 1017-1024.
22. Stadelmann P. JEMS. URL:<http://www.jems-saas.ch>.
123. Kubel C., Gonzalez-Ronda L., Drummy L., Martin D. Defect-mediated curvature and twisting in polymer crystals// J PHYS ORG. – 2000. – V. 13. – P. 816-829.
24. Ke X., Bittencourt C. and Van Tendeloo G. Possibilities and limitations of advanced transmission electron microscopy for carbon-based nanomaterials// Beilstein Journal of Nanotechnology. – 2000. – V. 6. – P. 1541-1557.
25. Tosaka M., Kamijo T., Tsuji M., Kohjiya S., Ogawa T., Isoda S., Kobayashi T. High-resolution transmission electron microscopy of crystal transformation in solution-grown lamellae of isotactic polybutene-1// Macromolecules. – 2000. –V. 33 – P. 9666-9672.
26. Butler J., Joy. D, Bradley G., Krause S. Low-voltage scanning electron microscopy of polymers// Polymer. – 1995. – V. 36. – P. 1781-1790.
27. Wuhrer R. and Moran K. Low-voltage imaging and X-ray microanalysis in the SEM: challenges and opportunities// IOP conference series: Materials Science and Engineering. – 2016. – V. 109. – P. 1-14.
28. Stokes D. Environmental scanning electron microscopy for biology and polymer science// Microscopy and Analysis. – 2012. – V.1. – P.67-71.
29. Fazita N., Jayaraman K., Bhattacharyya D., Hossian S., Haafiz M., Khalil A. Disposal options of Bamboo fabric-reinforced poly(lactic) acid composites for sustainable packaging: biodegradability and recyclability// Polymers. – 2015. – V.7. – P.1476-1496.

30. Frank L., Hovorka M., Mikmekova S., Mikmekova E., Mullerova I., Pokorna Z. Scanning electron microscopy with samples in an Electric field// *Materials*. – 2012. – V.5. – P. 2731- 2756.
31. Zhao M., Ming B., Kim J., Gibbons L., Gu X., Nguyen T. et al. New insights into subsurface imaging of carbon nanotubes in polymer composites via scanning electron microscopy// *Nanotechnology*. - 2015. –V.26. – P.1-12.
32. Raabe D., Chen N., Chen L. Crystallographic texture, amorphization, and recrystallization in rolled and heat treated polyethylene terephthalate (PET)// *Polymer*. – 2004. – V.45. – P. 8265-8277.
33. Nijenhuis J., Dadivanyan N. and Gotz D. Metals and polymers under mechanical stress: ray texture analysis with the use of a tensile stage// *Acta physica polonica A*. – 2016. – V.130. – P.894-897.
34. Bohn A., Fink H.-P., Ganster J., Pinnow M. X-ray texture investigations of bacterial cellulose// *Macromolecular chemistry and physics*. – 2000. – V. 201. – P. 1913-1921.
35. Fosnaric M., Igli A., Kroll D., May S. Monte Carlo simulations of a polymer confined within a fluid vesicle//*Soft Matter*. – 2013. – V.9. – P.3976-3984.
36. Manka A., Nowicki W., Nowicka G. Monte Carlo simulations of a polymer chain conformation. The effectiveness of local moves algorithms and estimation of entropy// *J. Molecular Modelling*. – 2013. – P.3659-3670.
37. Revilla –López, G. Modeling biominerals formed by apatites and DNA / G. Revilla –López, J. Casanovas, O. Bertran, P. Turon, J. Puiggalí, C. Alemán // *Biointerphases*. – 2013. – V. 8. – N 10. – P. 1-15.
38. Streeter I., Deleeuw N. Binding of glycosaminoglycan saccharides to hydroxyapatite surfaces: a density functional theory study //*Proc. R. Soc. A*. – 2011. – V. 467. – P. 2084-2101.
39. Hestrin S., Asschner M., Mager J. Synthesis of cellulose by resting cells of *Acetobacter xylinum*// *Nature*. – 1947. – V.159. – P.64-65.
40. Brown R.M., Jr. The biosynthesis of Cellulose// *J.Macromol. Sci. A*. – 1996. – V. 33. – P. 1345-1373.

41. Chen P., Cho S., Jin H. Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science// *Macromolecular Research*. – 2010. – V.18. – P. 309-320.
42. Guhados G., Wan W., Hulter J. Measurement of the elastic modulus of single bacterial cellulose fibers using atomic force microscopy// *Langmuir*. – 2005. – V. 21. - P. 6642-6646.
43. Grande C., Torres F., Gomez C., Martinez-Pastor J. Morphological characterization of bacterial Cellulose-Starch nanocomposites// *Polymers and polymer composites*. – 2008. – V. 16. – P. 181-185.
44. Бабушкина Т.А., Климова Т. П., Штыкова Э. В., Дембо К. А., Волков В. В., Хрипунов А. К., Клечковская В.В. Исследование гель-пленок целлюлозы *Acetobacter xylinum* и ее модифицированных образцов методами ЯМР ^1H криопорометрии и малоуглового рентгеновского рассеяния // *Кристаллография*. – 2010. – Т.55. – С.319-325.
45. Atalla R. and VanderHart D. Native cellulose: A composite of two distinct crystalline forms // *Science*. -1984. – V. 223. – P. 283-285.
46. Fink H.-P., Purz H., Bohn A., Kunze J. Investigation of the supramolecular structure of never dried bacterial cellulose // *Macromolecular symposia*. – 1997. – V. 120. – P. 207 - 217.
47. Horii F., Yamamoto H. and Hirai, A. Microstructural analysis of microfibrils of bacterial cellulose // *Macromol. Symp*. – 1997. – V. 120. – P. 197-205.
48. Yamamoto H., Horn F. In situ crystallization of bacterial cellulose I. Influences of polymeric additives, stirring and temperature on the formation celluloses I_α and I_β as revealed by cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS) ^{13}C NMR spectroscopy // *Cellulose*. – 1994. – V. 1. – P. 57-66.
49. Yamamoto H., Horii F., Hirai A. In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of polymeric additives with different molecular weights on the formation of celluloses I_α and I_β at the early stage of incubation// *Cellulose*. – 1996. –V. 3. – P. 229-242.
50. Iwata T., Indrarti L., Azuma J.-I. Affinity of hemicellulose for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*// *Cellulose*. – 1998. – V. 5. – P. 215-228.

51. Sugiyama J., Vuong R., Chanzy H. Electron diffraction study on the two crystalline phases occurring in native cellulose from analgal cell walle// *Macromolecules*. – 1991. – V. 24. – P. 4168-4175.
52. Wada M., Okano T., Sugiyama J. Synchrotron-radiated X-ray and neutron diffraction study of native cellulose // *Cellulose*. – 1997. –V. 4. – P. 221-232.
53. Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., Langan, P. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose 1(alpha), from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. // *J. Am.Chem. Soc.* – 2003. – V. 125. – P.14300-14306.
54. Клечковская В.В., Баклагина Ю.Г., Степина Н.Д., Хрипунов А.К., Буффа Ф., Суворова Е.И., Занавескина И.С., Ткаченко А.А., Гладченко С.В. К структуре целлюлозы *Acetobacter xylinum* // *Кристаллография*. – 2003. – Т. 48. – С. 813-820.
55. Czaja W., Young D., Kawecki M., Brown R. M. Jr. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications // *Biomacromoleculs.* – 2007. – V. 8. – P.1-12.
56. Petersen N., Gatenholm P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives// *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2011 – V.91. – P. 1277-1286.
57. Torres F., Commeaux S., Troncoso O. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials//*J.Funct. Biomater.* – 2012. –V.3. – P. 864-878.
58. Dugan J., Gough J., Eichhorn S. Bacterial cellulose scaffolds and cellulose nanowhiskers for tissue engineering// *Nanomedicine*. – 2013. –V. 8. – P. 297-298.
59. Rajwade J., Paknikar K., Kumbhar J. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine// *Applied Microbiology and biotechnology*. – 2015. – V.99. – P. 2491-2511.
60. Sulaeva I., Henniges U., Rosenau T., Potthast A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: properties and modifications. A review// *Biotechnology Advances*. – 2015. – V. 33. – P.1547-1571.
61. Krystynowicz A., Czaja W., Pomorski L., Kolodziejczyk M. and Bielecki S. The evaluation of usefulness of microbial cellulose as wound dressing material// *In 14th*

Forum for Applied Biotechnology. Proceedings Part I. Meded Fac Landbouwwet-Rijksuniv. Gent. – 2000. – V.1. – P. 213–220.

62. Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown R. M. Jr. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds //Biomaterials. – 2006. – V. 27. – P. 145-151.

63. Li Y., Jiang H., Zheng W., Gong N., Chen L., Jiang X. and Yang G. Bacterial cellulose– hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair // Journal of Materials Chemistry B. – 2015. – V. 3. – P. 3498-3507.

64. Mualla S., Farahat R., Basmaji P., Olyveira G., Costa L., da Costa Oliveira J.,Francozo G. Study of Nanoskin ECM-Bacterial Cellulose Wound Healing/United Arab Emirates // Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology. – 2016. – V. 7. – P. 109-117.

65. Liyaskina E., Revin V., Paramonova E. , Nazarkina M., Pestov N., Revina N., Kolesnikova S. Nanomaterials from bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing // Journal of Physics: Conf. Series. Nanomaterials from bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. – 2017. – V.784. – P. 1-7.

66. Pinto R., Neves M., Neto C. and Trindade T. Composites of Cellulose and Metal Nanoparticales// Intech: Nanocomposites. – 2012. – P.1-24.

67. Maneerung T., Tokura.S, Rujiravanit R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing// Carbohydr. Polym. – 2008. – V. 72. – P. 43-51.

68. Hernane S. Barud, Tha'is Regiani, Rodrigo F. C. Marques, Wilton R. Lustri, Younes Messaddeq, and Sidney J. L. Ribeiro//Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes// Journal of Nanomaterials. – 2011. – V. 2011. – P.1-8.

69. Hu, W., Chen, S., Li, X., Shi, S., Shen, W., Zhang, X. and Wang,H., *In situ* synthesis of silver chloride nanoparticles into bacterial cellulose membranes// Mater. Sci. Eng. C. – 2009. – V. 29. – P.1216–1219.

70. Кленин С.И., Тарасова Э.В., Асеев В.О. и др. Ассоциативные явления в водных растворах комплексов поли-N-винилпирролидон – фуллерен C₇₀ //Высокомолек. соедин. Б. – 2004. – Т.46. – С.1099-1104.

71. Лебедев В.Т., Торок Д., Клюбин В.В. и др. Структура растворов звездообразных производных фуллерена C₆₀ на основе поли-N-винилпирролидона в D₂O: данные дифракции нейтронов и динамического рассеяния света // *Высокомолек. соедин. А.* – 2004. – Т. 46. – С. 875-881.
72. Da Ros T., Spalluto G., Prato M. // *Croat. chem. acta.* – 2001. – V. 74. – P. 743-755.
73. URL:<http://www.dermafill.com>
74. URL:<http://nanoderm.ca>
75. Zaborowska M., Bodin A., Popp J., Goldstein A., Gatenholm P. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration// *Acta Biomater.* – 2010. – V. 6. – P. 2540- 2547.
76. Gao X., Shi Z., Liu C., Yang G., Silberschmidt V. Fracture Behaviour of bacterial cellulose hydrogel: microstructural effect// *Procedia Structural Integrity.* – 2016. – V. 2. – P. 1237-1243.
77. Yin N., Chen S., Ouyang Y., Tang L., Yang J., Wang H. Biomimetic mineralization synthesis of hydroxyapatite bacterial cellulose nanocomposites// *Progress in natural science: Materials International.* – 2011. – V. 21. –P. 472-477.
78. Olyveira G., Santos M., Costf L., Daltro P., Basmaji P., Daltro G., Guastaldi A. Bacterial cellulose nanobiocomposites for dental materials scaffolds// *J. Biomat. Tissue Eng.* – 2014. – V.4. – P.1-7.
79. Xing Q., Zhao F. Porous biocompatible three-dimensional scaffolds of cellulose microfiber /gelatin composites for cell culture// *Acta Biomaterialia.* – V. 6. – P. 2132–2139.
80. Mututuvari T., Harkins A., Tran C. Facile synthesis, characterization, and antimicrobial activity of cellulose-chitosan-hydroxyapatite composite material: a potential material for bone tissue engineering// *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2013. – V. 11. – P. 3266-3277.
81. Wang B., Yang D., Zhang H., Huang C., Xiong L., Luo J., Chen X. Preparation of esterified bacterial cellulose for improved mechanical properties and the microstructure of Isotactic Polypropylene/Bacterial cellulose composites// *Polymers.* – 2016. – V. 8. – P.1-11.

82. Jing W., Chunxi Y., Yizao W., Honglin L., Fang H., Kerong D., Yuan H. Laser patterning of bacterial cellulose hydrogel and its modification with gelatin and hydroxyapatite for bone tissue engineering//Soft materials. – 2013. – V. 11. – P.173-180.
83. Bryaskova R., Pencheva D., Nikolov S., Kantardjiev T. Synthesis and comparative study on the antimicrobial activity of hybrid materials based on silver nanoparticles (AgNPs) stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP)// J. of Chemical Biology. – 2011. – V.4. – P. 185-191.
84. Tang J., Chen W, Su W, Li W, Deng J. Dendrimer- encapsulated nanoparticles and antibacterial activity on cotton fabric // J. Nanosci Nanotechnol. – 2013. – V. 13. – P. 2128-2135.
85. Cho K., Park J., Osaka T., Park S. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient // Electrochimica Acta. – 2005. – V. 51. – P. 956-960.
86. Dura'n N., Marcato P., De S., Gabriel I., Alves O., Esposito E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment// J Biomed Nanotechnol. – 2007. – V. 3. – P. 203-208.
87. Kanchana S., Santhanalakshmi J. In vitro antibacterial activity exhibited by silver, copper and nickel nanoparticles stabilized by PEG and PVP polymers // International Journal of Research in Pharmacy and chemistry. – 2016. – V. 6. – P. 859-868.
88. Wang C., Liu C., Wang C., Chien C., Hwu Y., Liu R. et al. Intense X-ray induced formation of silver nanoparticles stabilized by biocompatible polymers// Applied Physics A. – 2009. – V. 97. – P. 295-300.
89. Yu W., Xie H., Chen L., Zhang C. Synthesis and characterization of monodispersed copper colloids in polar solvents // Nanoscale Res Lett. – 2009. – V. 4. – P. 465-470.
90. Liu H., Wang H., Guo R., Cao X., Zhao J., Luo Y. et al. Size-controlled synthesis of dendrimer-stabilized silver nanoparticles for X-ray computed tomography imaging applications// Polymer Chemistry. – 2010. – V. 1. – P. – 1677-1683.

91. Dang T., Le T., Fribourg-Blanc E., Dang M. The influence of solvents and surfactants on the preparation of copper nanoparticles by a chemical reduction method // *Adv.Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* – 2011. – V.2. – P.1-7
92. Musik I., Koziol-Montewka M., Tos-Luty S., Pasternak K., Latuszynska J., Tokarska M., Kielzykowska M. Immunomodulatory effect of selenosemicarbazides and selenium inorganic compounds, distribution in organs after selenium supplementation // *BioMetals.* – 1999. – V. 12. – P. 375-382.
93. Kizemidjian- Schumacher L., Roy M. Selenium and immune function// *Z. Ernährungswiss.* – 1998. – V. 37. – P.50-56.
94. Gallegos A., Berggren M., Gasdaska J.R., Powis G. Mechanism of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium // *Cancer Res.* – 1997. – V. 57. – P. 4965-4970.
95. Валуева С.В., Боровикова Л.Н., Коренева В.В., Назаркина Я.И., Киппер А.И., Копейкин В.В. Структурно-морфологические и биологические свойства наночастиц селена, стабилизированных бычьим сывороточным альбумином// *Журнал физ. Химии.* – 2007. – Т.81. – С. 1329-1333.
96. Suvorova E.I., Klechkovskaya V.V. Effect of Polymer matrix on structure of Se particles formed in aqueous solutions during redox process// *Crystallography reports.* – 2010. –V.55. – P. 1116-1121.
97. Копейкин В.В., Валуева С.В., Киппер А.И., Филиппов А.П., Боровикова Л.Н., Суворова Е.И., Назаркина Я.И., Матвеева Н.А., Островская Л.Д. Формирование наночастиц селена в редокс-системе селенит-аскорбат в водных растворах полиэлектролитных комплексов различного состава// *Журнал прикладной химии.* – 2005. – Т.78. – С.1514-1517.
98. Ю. Г. Баклагина, А. К. Хрипунов, А. А. Ткаченко и др. Сорбционные свойства гель-пленок бактериальной целлюлозы // *Журнал прикладной химии.* — 2005. — Т. 78. — С. 1197–1202.
99. Баринов С.М. Керамические и композиционные материалы на основе фосфатов кальция для медицины// *Успехи химии.* – 2010. – Т. 79. – С. 13-29.

100. Путляев Современные биокерамические материалы// Соросовский образовательный журнал. – 2004. – Т.8. – С.44-50.
101. Данильченко С.Н. Структура и свойства апатитов кальция с точки зрения биоминералогии и биоматериаловедения//Вестник СумДУ. – 2007. – Т.2. –С. 33-59.
102. Nudelman F., Pieterse K., George A., Bomans P., Friedrich H., Brylka L., Hilbers P., de With G., Sommerdijk N. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors// Nature Materials. – 2010. –V.9. P. 1004-1009.
103. McNally E., Schwarcz H., Botton G., Arsenault A. A model for the ultrastructure of bone based electron microscopy of ion-milled sections// PLoS One. – 2012. – V.7. – P.1-11.
104. Аврунин А.С., Тихилов Р.М., Паршин Л.К., Мельников Б.Е. Иерархическая организация скелета фактор регламентирующий структуру усталостных повреждений// Травматология и ортопедия России. – 2011. – Т.2. – С.93-100.
105. А.С. Аврунин, Р.М. Тихилов, Л.К. Паршин, И.И. Шубняков. Наноразмерный механизм жесткости и прочности кости // Травматология и ортопедия России. – 2008. – Т. 2. – С. 77–83.
106. Wang Y., Von Euw S., Fernandes F., Cassaignon S., Selmane M., Laurent G., Pehau-Arnaudet G., Coelho C., Bonhomme-Coury L., Giraud-Guille M., Babonneau F., Azaïs T., Nassif N. Water-mediated structuring of bone apatite// Nature Materials. – 2013. – V.12. – P.1144-1153.
107. Mucalo M. Hydroxyapatite (HAP) for biomedical applications// Woodhead Publishing series in Biomaterials. – 2015. – P.404.
108. Haider A., Haider S., Han S., Kang I. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review//RSC Adv. – 2017. – V.7. –P.7442-7458.
109. Prakasam M., Locs J., Salma-Ancane K., Loca D., Largeteau A., Berzina-Cimdina L. Fabrication, properties and application of dense hydroxyapatite: a review// J. Funct. Biomater. – 2015. – V.6. – P.1099-1140.

110. Kay M. I., Young R. A., Posner A.S. Crystal Structure of Hydroxyapatite// Nature. -1964. – V. 204. – P. 1050-1052.
111. Dorogkin S. Nanodimensional and nanocrystalline calcium orthophosphates// American Journal of Biomedical Engineering. – 2012. –V.3. – P.48-97.
112. Suvorova E.I. Buffat P.A. Electron diffraction from micro- and nanoparticles of hydroxyapatite// J. Microscopy. – 1999. – V.196. – P.46-58.
113. Limin Sun, Laurence C. Chow, Stanislav A. Frukhtbeyn John E. Bonevich. Preparation and Properties of Nanoparticles of Calcium Phosphates With Various Ca/P Ratios// Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology. - 2010. –V.115. – P.243-255.
114. Chenab F., Zhub Y., Wub J., Huanga P., Cuia D.. Nanostructured Calcium Phosphates: Preparation and Their Application in Biomedicine// Nano Biomed. Eng. – 2012. – V. 4. – P. 41-49.
115. Liou E., Chian S., Chen S.-Y., Lee H., Bow J. Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders//Biomaterials. – 2004. –V.25. –P.189-196.
116. Мелихов И.В., Комаров В.Ф., Северин А.В., Божевольнов В.Е., Рудин В.Н «Двумерно- кристаллический гидроксиапатит» // ДАН. – 2000. – Т.373. – С. 355-358.
117. Суворова Е.И., Клечковская В.В., Комаров В.Ф, Северин А.В., Мелихов И.В., Буффа Ф.А. Электронная микроскопия биоматериалов на основе гидроксиапатита// Кристаллография. – 2006. – Т.51. – С.939-946.
118. Суворова Е.И., Буффа Ф.А. Проявление размерного эффекта на картинах рентгеновской и электронной дифракции от частиц гидроксиапатита.// Кристаллография. – 2001. – Т. 46. – P.796 – 804.
119. Biggemann, D., da Silva, M. H. P., Rossi, A. M., and Ramirez, A. J., High-resolution transmission electron microscopy study of nanostructured hydroxyapatite. //Microsc. Microanal. – 2008. – V. 14. – P. 433-438.
120. URL:http://www.ceramisis.com/bone_graft_substitutes.html
121. URL:<http://www.wright.com/products-biologics>

122. Зуев В.П., Сергеев П.В., Мелихов И.В. О Влиянии гидроксиапатита на пролиферативную активность клеток костной ткани// Химико-фармацевтический журнал. – 1994. – Т. 2. – С. 10-14.
123. Панкратов А.С., Древаль А.А., Пылаев А.С., Коршунов В.М., Кафарская Л.И., Лекишвили М.В. Использование остеопластических материалов при лечении нагноившейся костной раны нижней челюсти в эксперименте// Российский стоматологический журнал. – 2000. – Т. 5. – С. 4-6.
124. Rudin V.N., Komarov V.F., Melikhov I.V., et al. Stomatic Composition. European Patent № 950 354.7.
125. Рудин В.Н., Комаров В.Ф., Мелихов И.В. и др. Способ получения суспензии гидроксиапатита. Патент РФ № 2122520. Опубл.1998.
126. Баринов С.М., Комлев В. С.. Биокерамика на основе фосфатов кальция//М.:Наука. – 2005. – С.204.
127. Хлусов И.А.// Основы биомеханики биосовместимых материалов и биологических тканей: учебное пособие/ Хлусов И.А., Пичугин В.Ф., Рябцева М.А. // Томск: Издательство Томского политехнического университета. – 2007. – С. 149.
128. Sarkar R., Banerjee G. Ceramic Based Bio-Medical Implants// InterCeram. – 2010. – V. 59. –P. 98-102.
129. Суворова Е.И., Клечковская В.В., Бобровский В.В., Хамчуковский Ю.Д., Клубович В.В. Наноструктура покрытия, полученного плазменным распылением гидроксиапатита»// Кристаллография. – 2003. –Т.48. – С. 928 – 934.
130. Puska M., Aho A., Vallittu P. Polymer composites for done reconstruction//In Tech:Advances in Composite materials- analysis of natural and man-made materials. – 2011. – P.55-72.
131. Kikuchi M., Koyama Y., Edamura K., Tanaka S. Synthesis of Hydroxyapatite/Collagen Bone –Like nanocomposite and its biological reactions// Intech:Advances in Nanocomposites - Synthesis, Characterization and Industrial Applications. – 2011. – P.181-194.

132. Wan A.A. , Khor E., Hastings G.W. Hydroxyapatite modified chitin as potential hard tissue substitute material // *J. Biomed Mater. Res.* – 1997. – V. 38. – P. 235–24.
133. Hu Q., Li B., Wang M., Shen J. Preparation of bioactive chitosan-hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridisation: a potential material as internal fixation of bone fracture // *Biomater.* – 2004. – V. 25. – P. 779–785.
134. Chang M.C., Ko C.C., Douglas W.H. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposites // *Biomater.* – 2003. – V. 24. – P. 2853–2862.
135. 14. Rosseeva E. V., Buder J., Simon P., Schwarz U., Frank-Kamenetskaya O. V., Kniep R. Synthesis, characterization and morphogenesis of carbonated fluorapatite–gelatin nanocomposites: a complex biomimetic approach toward the mineralization of hard tissues // *Chem. Mater.* – 2008. – V. 20. – P. 6003–6013.
136. Mucalo M. R., Yokogawa Y., Toriyama M., Suzuki T., Kawamoto Y., Nagata F. et al. Growth of calcium phosphate on surface–modified cotton // *J. Mater. Sci Mater. Med.* – 1995. – V.6. – P. 597–605.
137. Wang L., Nemoto R., Senna M. Effects of alkali pretreatment of silk fibroin on microstructure and properties of hydroxyapatite–silk fibroin nanocomposite // *J. Mater. Sci Mater. Med.* – 2004. – V. 5. – P. 261–265.
138. Wan Y. Z., Hong L., Jia S. R., Huang Y., Zhu Y., Wang Y. L., Jiang H. J. Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites // *Comp. Sci. Technol.* – 2006. – V.66. – P. 1825–1832.
139. Хрипунов А.К., Баклагина Ю.Г., Синяев В.А., Шустикова Е.С., Парамонов Б.А., Романов Д.П., Смыслов Р.Ю., Ткаченко А.А. Исследование нанокомпозитов на основе гидратированных фосфатов кальция и целлюлозы *Acetobacter xylinum* // *Физика и химия стекла.* – 2008. – Т. 34. – С. 248–258.
140. Баклагина Ю.Г., Лукашева Н.В., Хрипунов А.К., Ключковская В.В., Архарова Н. А., Романов Д.П., Толмачев Д. А. Взаимодействие между наноразмерными кристаллическими компонентами композита на основе целлюлозы *Acetobacter xylinum* и фосфатов кальция // *Высокомолекулярные соединения. Серия А.* – 2010. – Т. 52. – С. 1–13.

141. Nge T., Sugiyama J. and Bulone V. Bacterial Cellulose-Based Biomimetic Composites. Intech:Biopolymers. – 2010. – P. 345-368.
142. Антонова Л.В., Насонова М.В., Кудрявцева Ю.А., Головкин А.С. Возможности использования полиоксиалканоатов и поликапролактона в качестве сополимерной основы для создания тканеинженерных конструкций в сердечно-сосудистой хирургии// Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – Т.11. –С.128-134.
143. Кулаков А.А., Григорьян А.С., Кротова Л.И., Попов В.К., Воложин А.И., Лосев В.Ф. Процессы регенерации в костных дефектах при имплантации в них композиционного материала различной плотности на основе полилактида, наполненного гидроксиапатитом//Стоматология. - 2009. – Т.88. – С.17-23.
144. Thanh D., Trang P.,Huong H.,Park J. Fabrication of poly(lactid acid)/hydroxyapatite (PLA/Hap) porous nanocomposite for bone regeneration//Int. J. Nanotech. – 2015. – V. 12. – P. 391-404.
145. Moon R.J., Martini A., Nairn J., Simonsen J., Youngblood J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites// Chem. Soc. Rev. - 2011. – V.40. – P. 3941-3994.
146. Klemm D., Kramer F., Moritz S., Lindström, Ankerfors M., Gray D., Dorris A. Nanocelluloses : A new family of nature-based materials // Angew. Chem. Int. Ed. - 2011. - V. 50. – P. 5438-5466.
147. Torres F.G., Commeaux S., Troncoso O.P. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials// J. of Functional biomaterials. – 2012. - V. 3. – P. 867-878.
148. Grande C., Torres F., Gomez C., Bano M. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications //Acta Biomaterialia – 2009. – V. 5. - P. 1605–1615.
149. Zimmermann K. A., LeBlanc J.M., Sheets K.T., Fox R. W. and Gatenholm P. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications// Materials Science and Engineering C. – 2011. – V. 31. – P. 43–49.

150. Tazi N., Zhang Z., Messaddeq Y., Almeida-lobes L., Zanardi L.M., Levinson D., Rouabhia M. Hydroxyapatite bioactivated bacterial cellulose promotes osteoblast growth and the formation of bone nodules// *AMB Express*. – 2012. – V. 2. – P. 1-10.
151. Petrauskaite O., Gomes P.S., Fernandes M. H., Juodzbaly G., Stumbras A., Maminskas J., Liesiene J. and Cicciu M. Biomimetic mineralization on a macroporous cellulose-based matrix for bone regeneration// *BioMed Research Int*. – 2013. – V.2013. P.1-9.
152. Wan Y. Z., Hong L., Jia S. R., Huang Y., Zhu Y., Wang Y. L., Jiang H. J. Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites// *Comp. Sci. Technol*. – 2006. – V. 66. – P. 1825–1832.
153. Wan Y. Z., Huang Y., Yuan C. D., Raman S., Zhu Y., Jiang H. J., He F. Gao C. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites for biomedical application// *Mater. Sci. Eng. C*. – 2007. – V. 27. – P. 855–864.
154. Yin N., Chen S., Ouyang Y., Tang L., Yang J., Wang H. Biomimetic mineralization synthesis of hydroxyapatite bacterial cellulose nanocomposites// *Progress in Natural Science: Materials International*. – 2011. – V. 21. – P. 472-477.
155. Wan Y.Z., Gao C., Luo HL, He F, Liang H, Li XL, Wang YL. Early growth of nano-sized calcium phosphate on phosphorylated bacterial cellulose nanofibers// *J Nanosci. Nanotechnol*. – 2009. – V. 9. – P. 6494-5000.
156. Gao C., Xiong G.Y., Luo H.L, Ren K.J., Huang Y., Wan Y.Z., Dynamic interaction between the growing Ca-P minerals and bacterial cellulose nanofibers during early biomineralization process// *Cellulose*. – 2010. –V.17. – P. 365-373.
157. Nge T.T. and Sugiyama J. Surface functional group dependent apatite formation on bacterial cellulose microfibrils network in a simulated body fluid// *Journal of Biomedical materials research Part A*. – 2007. – V. 81A. – P. 124-134.
158. Lai C., Zhang S. J., Wang L. Q., Sheng L.Y., Zhou Q.Z., Xi T.F. The relationship between microstructure and in vivo degradation of modified bacterial cellulose sponges// *J of Mater. Chem. B*. –2015. –V. 3. – P. 9001-9010.

159. Chen PY and Lai JT. Mechanical analysis of biocomposite material from bacterial cellulose and hydroxyapatite// *Journal of Medical and Bioengineering*. – 2013. – V. 2. – P. 228-231.
160. Cohen J.B. Diffraction methods in material science// New York: The Macmillan Co. -1966. – P.357.
161. Пинскер З.Г. Дифракция электронов / З. Г. Пинскер – Москва: Издательство Академии наук СССР. 1949. – С. 404.
162. Хирш П. Электронная микроскопия тонких кристаллов / П. Хирш, А. Хови, Р. Николсон, Д. Пэшли, М. Уелан – Москва: Мир. – 1968. – С. 574.
163. Каули Дж. Физика дифракции// М.: Мир. – 1979. - С. 431.
164. Илюшин А.С., Орешко А.П. Дифракционный структурный анализ// Киров: ООО Издательский дом «Крепостновъ». – 2013 - С.616
165. Phifer D., Tuma L., Wandrol P., Young R. Improving SEM imaging performance using beam deceleration// *Microscopy today*. – 2009. – V.17. – P. 40-49.
166. Asahina S., Togashi T., Terasaki O., Takami S., Adschiri T., Shibata M., Erdman N. High-resolution low-voltage scanning electron microscope study of nanostructured materials// *Microscopy and analysis*. – 2012. – V.26. – P.12-14.
167. Fujimoto F., Periodicity of crystal structure images in electron microscopy with crystal thickness// *Phys. Status Solidi*. – 1978. – V.45. – P.99.
168. Kambe K. Visualization of Bloch waves of high energy electrons in HRTEM// *Ultramicroscopy*. – V.10. – P.223.
169. Kanaya K. Okayama S. Penetration and energy-loss theory of electrons in solid targets// *J. Physics D Applied Physics*. – 1972. – V.5. – P. 43–58.
170. Zamanian B., Masaeli M., Nichol J., Khabiry M., Hancock M., Bae H., Khademhosseini A. Self-Assembly of Cell-Laden Hydrogels on the Liquid-Air Interface// *Small*. – 2010 – V. 6. – P. 937-944.
171. Burbank R.D. The crystal structure of beta-monoclinic selenium// *Acta Crystallographica*. – 1952. – V. 5. – P. 236-246.
172. Foss O., Janickis V. Crystal structure of gamma-monoclinic Selenium// *J. Chemical Society. Chemical communications*. – 1977. – V.1977. – P. 834-835.

173. Cherin P., Unger P. Refinement of the crystal structure of alpha-monoclinic Se// *Acta Crystallographica B*. – 1972. – V. 28. – P. 313-317.
174. Cherin, P., Unger P. The crystal structure of trigonal selenium// *Inorganic Chemistry*. –1967. – V. 6. – P. 1589-1591.
175. Degtyareva V., Sikorov V. Cubic modification of selenium by shock compression// *Soloid State Physics*. – 1977. – V. 19. – P.2201-2203.
176. Miyamoto Y. New modification of selenium composed of Se₆ molecular// *Fukuoka Daigaku Rigaku Shuho*. – 1979. – V. 9. – P. 1-13.
177. Owen E.A., Yates E.L. Precision measurements of crystal parameters// *J. Chemical Physics*. – 1935. – V. 3. – P. 605-616.
178. Novgorodova D., Gorshkov A., Mokhov A. Native silver and its new structural modifications// *Zapiski Vsesoyuznogo Mineralogicheskogo Obshchestva*. – 1979. – V.108. – P. 552-554.
179. Nuriev I., Imamov R., Shafizade R. Structure of a new cubic phase in the Ag-Se system// *Kristallografiya*. – 1971. – V.16. – P. 1028-1030.
180. Oliveria M., McMullan R., Wuensch B. Single crystal neutron diffraction analysis of the cation distribution in the high-temperature phases alpha-Cu_{2-x}S, alpha-Cu_{2-x}Se, and alpha-Ag₂Se// *Solid State Ionics*. – 1988. – V.28. – P.1332-1337.
181. Wiegers G. The crystal structure of the low-temperature form of silver selenide// *American Mineralogist*. – 1971. – V.56. – P. 1882-1888.
182. Pinsker Z., Ching-Liang C., Imamov R., Lapidus E. Determination of the crystal structure of the low-temperature phase alpha-Ag₂Se// *Kristallografiya*.- 1965. – V.10. – P. 275-283.
183. Глимчер М. Молекулярная биология минерализованных тканей, в частности костной ткани. Современные проблемы биофизики// Т. II . М.: Иностр. лит. - 1961.- С. 94–127.
184. Suvorova E.I., Petrenko P.P., Buffat P.A., Scanning and transmission electron microscopy for evaluation of order/disorder in bone structure// *Scanning*. – 2007. – V. 29. – P.162-170.

185. Tolmachev D.A., Lukasheva N.V. Interactions Binding Mineral and Organic Phases in Nanocomposites Based on Bacterial Cellulose and Calcium Phosphate // *Langmuir*. – 2012. – V. 28. – P. 13473–13484.

186. Толмачев, Д.А., Лукашева Н.В. Исследование процесса минерализации наночибрилл нативной бактериальной целлюлозы в растворах минеральных ионов. Моделирование методом молекулярной динамики // *Высокомолекулярные соединения Серия А*. – 2014. – Т. 56. – С. 464–477.

187. S.N. Khan, R.M. Warkhedkar and A.K. Shyam. Human Bone strength evaluation through different mechanical tests// *International journal of current engineering and technology*. – 2014. – V. 2. – P. 539-543.