АННОТАЦИЯ
Диссертации на соискание степени доктора философии (PhD)
По специальности «6D074000-Наноматериалы и нанотехнологии»
Талипова Айжан Бериккызы
Биоактивный композитный материал на основе бактериальной целлюлозы, гидроксиапатита и наноантисептиков: структура и свойства

Общая характеристика диссертационной работы. Работа посвящена экспериментальной разработке метода получения композитных материалов на основе гидрогелевой нанофибриллярной пленки бактериальной целлюлозы (БЦ) с внедренными наночастицами $Ti_3C_2T_x$MXene и гидроксиапатита (ГАП). Исследуется структурно-фазовое состояние полученных нанокомпозитов, их морфологические характеристики, особенности антибактериального действия и биосовместимость в условиях *in vitro*.

Актуальность темы исследования. Текущий этап развития наноматериалов и биомедицинской инженерии характеризуется активной разработкой антимикробных конструкций, сочетающих функциональную эффективность и биосовместимость. Особенно это касается материалов, предназначенных для борьбы с раневыми инфекциями, связанными с антибиотикорезистентными патогенами, образующими биопленки. Инновационный подходом к созданию таких нанокомпозитных материалов, предусматривает применение новых неорганических антисептических компонентов или модификация биоматериалов биоактивными ионами для обеспечения не только антимикробной активности, но и инициирования контролируемой реакции в тканях, способствующей ранозаживлению. Предметом многих разработок в этой области стали раневые покрытия на основе гидрогеля из БЦ – биополимера, имеющего сверхтонкую трехмерную наносетчатую структуру. Однако, БЦ создает лишь физический барьер для раневой инфекции, поэтому нужна альтернативная стратегия, направленная на разработку бифункциональной платформы, препятствующей образованию и/или распаду биопленок в месте раны, и при этом стимулирующей кожную регенерацию. Одним из компонентов такой платформы могут быть MXenes - двухмерные (2D) наноматериалы, относящиеся к семейству карбидов, нитридов и карбо-нитридов переходных металлов. Имеются обнадеживающие сведения о том, что MXenes или материалы с ними препятствуют образованию биопленок и даже способствуют их деструкции.

С другой стороны, есть информация, что MXenes могут проявлять цитотоксичность в высоких концентрациях, что ограничивает их использование в некоторых медицинских приложениях. Проблему соблюдения баланса между эффективностью и биосовместимостью может решить добавление в композит ГАП, который может обеспечить снижение цитотоксичности и ускорение заживления ран посредством кальций-опосредованной коагуляции, необходимой для регенерации тканей. Представляется, что интеграция MXene и ГАП в каркас БЦ объединит антибактериальное действие MXene с биоактивностью ГАП, формируя

многофункциональную платформу.

Несмотря на активные исследования в данной области, информация о композитах, состоящих из БЦ с включенными в нее наночастицами ГАП и MXene, отсутствует. Ранее сообщалось лишь о двукомпонентных системах БЦ/MXene, БЦ/ГАП и ГАП/MXene.

В связи с этим необходима разработка способа синтеза гибридного наноматериала БЦ/MXene/ГАП, что требует тщательной оптимизации всех этапов процесса. Особое внимание должно быть уделено выбору условий формирования каждого компонента, их последовательности введения и обеспечению устойчивого взаимодействия между органической матрицей и неорганическими нанофазами. При этом способ получения композита должен предусматривать сохранение гелевой формы БЦ с её нанофибриллярной структурой, так как именно в этом состоянии материал может проявлять свои характерные физико-химические свойства.

Цель работы: Разработать и охарактеризовать структурные и антимикробные свойства трехкомпонентного нанокомпозитного материала из бактериальной целлюлозы, MXene и гидроксиапатита.

З**адачи исследования:**

- провести анализ структурных и механических свойств гель-пленок БЦ, полученной на питательной среде с мелассой;
- получить композитные материалы на основе БЦ с армирующими компонентами: Mxene и гидроксиапатитом;
- исследовать элементный, фазовый, функциональный составы и морфологию нано-гель-пленки БЦ после интеркаляции в нее нанокомплексов MXene и гидроксиапатита;
- подобрать способ стерилизации композитного гидрогеля, обеспечивающий сохранение его структурных и функциональных свойств;
- изучить особенности проявления антимикробного и антибиоплёночного действия трёхкомпонентного композитного материала в *Time-kill* тесте и на модели хронической раневой биоплёнки (LCWB);
- определить цитотоксичность и биосовместимость трехкомпонентного композитного материала в условиях *in vitro.*

Объекты исследования: Гель-пленки БЦ, композиты БЦ/ГАП, БЦ/Mxene и БЦ/ГАП/MXene.

Методы исследования: Получение БЦ – поверхностное культивирование; $Ti_3C_2T_x$ – химическое травление; ГАП – химическое осаждение; БЦ/ГАП – *in situ* и *ex situ* модификации; ГАП/MXene – физико-химическая гибридизация; Композиты БЦ/ГАП/MXene и БЦ/MXene – метод погружения (*ex situ)*. Морфология плёнок и композитов – сканирующая электронная микроскопия (JSM-7800F); Структурно-фазовое состояние – просвечивающая электронная микроскопия, рентгеноструктурный анализ; Функциональный состав – ИК-спектроскопия (Bruker Alpha II FTIR); Элементный состав и пространственное распределение – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (JEOL JED-2300T CENTURIO SDD); Кристаллическая структура композитов – рентгеновская

дифракция (XRD) (PANalytical Empyrean (Malvern Panalytical); Химический состав – высокоразрешающая рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (HR-XPS); Прочность плёнок – разрывная машина «Instron»; Атибактериальная активность – Time-kill тест; Антибиоплёночная активность – метод микропланшетов, *in vitro* модель хронической раневой биоплёнки (LCWB); Биосовместимость – жизнеспособность, адгезивные свойства, метаболическая активность, морфология и пролиферация клеток мышиных фибробластов NIH3T3.

Научная новизна результатов исследования.

Получен новый нанокомпозитный материал БЦ/ГАП/MXene, предназначенный для создания многофункционального раневого покрытия, обладающего антисептическим, антибиопленочным и антиоксидантным действием.

Впервые показано, что включение комплекса ГАП/Mxene в матрицу БЦ методом *ex situ* минимизирует окисление двумерного карбида титана и сохраняет нановолокнистую гидрогелевую структуру БЦ.

Впервые предложен и оптимизирован состав экономичной питательной среды на основе мелассы, обеспечивающий сохранение нанофибриллярной структуры и механической прочности БЦ с повышенным уровнем ее биосинтеза.

Теоретическая значимость исследований. Теоретически и экспериментально обоснован выбор состава нанокомпозитного материала, в котором антимикробное и антибиоплёночное действие определяется взаимодействием функциональных нанофаз.

Обозначены пути экономически эффективного способа получения БЦ и ее функционализации неорганическими биоактивными компонентами: MXene и ГАП для получения биосовместимого композитного материала с высокой антимикробной активностью, низкой цитотоксичностью и прорегенеративными свойствами.

Представлены возможные механизмы антимикробного действия фукциональных компонентов композита, связанные с генерацией MXene-ами активных форм кислорода и опосредованным ГАП ингибированием полимеризации фибрина, разрушающим структуру биопленки.

Практическая ценность исследования.

Синергетическое взаимодействие двумерных наноструктур MXene и наночастиц ГАП, интегрированных в трёхмерный нанофибриллярный БЦ-скаффолд, имитирующий внеклеточный матрикс, формирует перспективный материал нового поколения для лечения хронических ран, инфицированных микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью.

Оптимизированная питательная среда на основе отходов сахарного производства, а также подобранные технологические параметры культивирования штамма-продуцента обеспечивают получение БЦ с воспроизводимой нанофибриллярной структурой и стабильными физико-механическими характеристиками. Она может использоваться при масштабируемом промышленном синтезе БЦ как наноструктурированной

матрицы для создания функциональных нанокомпозитных материалов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- БЦ, синтезированная на модифицированной питательной среде с добавлением 2% мелассы, характеризуется иерархически организованной нанофибриллярной архитектурой, представленной трёхмерной сетчатой матрицей из плотно переплетённых целлюлозных фибрилл наноразмерного диаметра, которая обуславливает пористую структуру материала и его высокую механическую прочность (37,12 ± 0,2 МПа).

- формирование наноструктурированного композитного материала с однородным распределением армирующих наночастиц обусловлено включением в матрицу БЦ методом *ex situ* предварительно сформированного путём физико-химической гибридизации нанокомплекса ГАП/MXene .

- БЦ, функционализированная Mxene, генерирующими активные формы кислорода, приобретает антимикробное свойства, а опосредованное ГАП ингибирование полимеризации фибрина и Ca^{2+} зависимой инактивации Bap белка ускоряет процесс ранозаживления.

Основные результаты исследований и выводы:

1. Механически прочная (37,12±0,2 МПа) и эластичная (удлинение на 3,28+0,2 %) наноструктурированная БЦ, состоящая из нановолокон диаметром 15–35 нм и фибриллярными пучками размером 50–150 нм формируется на модифицированной среде с мелассой (2%). Культивирование штамма *Komagataeibacter xylinus* С-3 на этой среде в течение 7 суток обеспечивает повышение продуктивности образования плёнки до 12,8 г/л и снижение себестоимости синтезируемого биополимера в 5 раз.

2. Получен наноструктурированный композитный материал БЦ/ГАП/MXene путем интеграции предварительно сформированного комплекса ГАП/MXene в матрицу БЦ методом *ex situ*, обеспечивающим равномерное распределение наночастиц ГАП и листов MXene в структуре БЦ.

3. Комплексный структурный анализ композита БЦ/ГАП/MXene подтвердил успешную интеграцию всех компонентов в наномасштабе. СЭМ и ЭДС выявили отдельные микроагломераты ГАП (1–5 мкм), встроенные в матрицу БЦ/MXene, с элементным картированием, подтверждающим колокализацию Ca и P из ГАП и Ti из MXene. Визуализация поперечного сечения с помощью TEM и FIB предоставила прямые доказательства наличия наночастиц ГАП (50–200 нм), закрепленных на границе раздела между слоями БЦ и MXene, подтверждая иерархическую архитектуру с разделением фаз. Анализ XPS продемонстрировал значительный сдвиг энергии связи Ti 2p ($\Delta \approx 2{,}5$ эВ) в композите БЦ/ГАП/Mxene по сравнению с БЦ/MXene, что указывает на сильные интерфейсные электронные взаимодействия между MXene и ГАП. Добавление MXene/ГАП повышало прочность на разрыв до 43 МПа и увеличивало относительное удлинение при растяжении на 8 %

4. Способы стерилизации нанокомпозита БЦ/ГАП/MXene холодной плазмой или этиленоксидом являются предпочтительными, поскольку обеспечивают минимальные изменения структуры и функциональных

свойств материала с сохранением электропроводности и фототермического отклика на уровне 94–98 % от исходного.

5. Включение нанокомплекса ГАП/MXene в БЦ придает композиту БЦ/ГАП/MXene высокую антибактериальную и антибиоплёночную активность в отношении клинически значимых патогенов с множественной лекарственной устойчивостью. Степень бактериостатического ингибирования роста 95% (*P. aeruginosa)* и 99% (*S. aureus)*. В физиологически релевантной модели хронической раневой биоплёнки (LCWB) наблюдалось снижение жизнеспособности MRSA до 98% и FQRPA до 86%.

6. Наноструктурированная архитектура композита БЦ/ГАП/MXene способствует высокой адгезии фибробластов NIH-3T3 к поверхности материала и их активной пролиферации. Клетки, культивируемые на среде с материалом, характеризовались высоким уровнем метаболической активности в МТТ-тесте (>81%), что указывает на отсутствие выраженной цитотоксичности и приемлемый уровень биосовместимости композита.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа была выполнена в рамках проектов: 1) 2679/ГФ4 «Разработка биокомпозиционных материалов на основе бактериальной целлюлозы для создания трансдермальных терапевтических систем»; 2) AP23488697 «Стратегия создания гидрогелевой фототермической платформы с усиленными антибактериальными и регенерационными свойствами для лечения инфицированных ран».

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 11 печатных работах, включая 4 статьи в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 3 статьи в республиканских научных журналах, включенных в перечень КОКСНВО МНВО РК, 4 тезисов в материалах международных конференций.

Личный вклад автора заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, анализе, интерпретации и оформлении полученных результатов, подготовке рукописей публикаций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 148 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, список использованных источников из 285 наименований. Работа включает 11 таблиц, 41 рисунков и 1 приложение.