

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«ТВЕРСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

АНДРИАНОВА
Яна Вячеславовна

**ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ НА САМООРГАНИЗАЦИЮ И
ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЕ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ L-ЦИСТЕИНА И
НИТРАТА СЕРЕБРА**

Специальность 1.4.4. Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Пахомов Павел Михайлович

Тверь, 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. СТРУКТУРА И ПРОЦЕССЫ САМООРГАНИЗАЦИИ В СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ ЦИСТЕИН-СЕРЕБРЯНОГО РАСТВОРА И В СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ ГЛУТАТИОНА (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	17
1.1. Введение в супрамолекулярную химию: особенности и основные понятия.....	17
1.2. Степень разработанности темы исследования: изучение систем на основе низкомолекулярных аминокислот и нитрата серебра и их отличия.....	26
1.3. Классификация, особенности строения и синтеза гелей.....	28
1.4. Исследование гидрогелей как супрамолекулярных систем.....	30
1.4.1. Исследование влияния катионов низкомолекулярных солей на структуру и свойства образующихся гидрогелей	35
1.4.2. Исследование влияния анионов низкомолекулярных солей на структуру и свойства образующихся гидрогелей.....	42
1.4.3. Методы исследования супрамолекулярных систем.....	47
1.5. Строение, свойства и возможные области применения цистеин-серебряных гидрогелей.....	50
1.6. Глутатион, как производное аминокислоты L-цистеина: особенности, значение, свойства и возможные области применения.....	54
1.7. Метиленовый синий: особенности, значение, свойства и возможные области применения.....	63
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	64
2.1. Объекты исследования.....	64
2.1.1. Методика приготовления исследуемых образцов.....	65
2.2. Методы исследования.....	68
2.2.1. Исследование вязкости цистеин-серебряных гидрогелей методом вибрационной вискозиметрии.....	68
2.2.2. Исследование процесса самоорганизации в цистеин-серебряном растворе и гидрогелях на его основе методом УФ-спектроскопии.....	69
2.2.3. Изучение химического строения получаемых систем методом ИК-спектроскопии.....	70

2.2.4. Определение размера и дзета-потенциала рассеивающих частиц в ЦСР методом динамического светорассеяния.....	72
2.2.5. Исследование процесса самоорганизации в цистеин-серебряном растворе и гелеобразования в системах на его основе методом кондуктометрии...	75
2.2.6. Изучение процессов координирования катионов металлов в структуре гидрогеля на молекулярном уровне методом рН-метрии	77
2.2.7. Анализ морфологии получаемых гидрогелей методом сканирующей электронной микроскопии.....	78
2.2.8. Изучение элементного состава получаемых гидрогелей методом рентгеноспектрального электронно-зондового анализа.....	78
2.2.9. Анализ морфологии получаемых гидрогелей методом просвечивающей электронной микроскопии.....	79
2.2.10. Микробиологическая активность исследуемых гидрогелей, и их способность к подавлению роста раковых клеток.....	80
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗМЕРЕНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	82
3.1. Исследование процесса самоорганизации в ЦСР.....	82
3.1.1. Определение энергии активации процесса самоорганизации в ЦСР методом УФ спектроскопии.....	82
3.1.2. Изучение процесса самоорганизации методом кондуктометрии и динамического светорассеяния.....	87
3.1.3. Изучение процесса самоорганизации в цистеин-серебряном растворе методом ИК-спектроскопии.....	89
3.2. Исследование процесса гелеобразования в ЦСР.....	90
3.2.1. Установление концентрационного диапазона исследуемых систем визуальным методом исследования.....	90
3.2.2. Проведение реологических исследований изменения вязкости в ходе процесса гелеобразования методом вибрационной вискозиметрии	93
3.2.3. Исследование процесса гелеобразования в гидрогелях методом УФ-спектроскопии.....	98
3.2.4. Изучение влияния катионов металлов на химическое строение получаемых гидрогелей методом ИК-спектроскопии	99
3.2.5. Определение размеров и дзета-потенциала частиц, образующихся в результате структурирования в гидрогелях, методом динамического светорассеяния.....	102

3.2.6. Исследование изменения электропроводности в процессе гелеобразования в системах с разными катионами металлов методом кондуктометрии.....	106
3.2.7. Определение зависимости изменения показателя кислотности в ходе координирования катионов металлов в структуре гидрогеля методом рН-метрии.....	108
3.2.8. Изучение морфологии получаемых гидрогелей методами просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии (с элементным анализом).....	109
3.2.9. Предполагаемый механизм структурирования (комплексобразования) в получаемых гидрогелях.....	112
3.3. Изучение свойств и процесса структурирования глутатиона и нитрата серебра.....	116
ГЛАВА 4. ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ЦСР.....	126
4.1. Анализ проявления микробиологической активности и способности к подавлению роста раковых клеток выбранных катионов и анионов исследуемых гидрогелей.....	127
4.2. Анализ проявления микробиологической активности и способности к подавлению роста раковых клеток выбранных композиций GSH/AgNO ₃	129
4.3. Возможность применения гидрогеля в качестве матрицы-переносчика для активного вещества – метиленового синего и проявление микробиологической активности получаемых трехкомпонентных гидрогелей.....	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	141
ВЫВОДЫ.....	144
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	146
Благодарности.....	160

Список сокращений и условных обозначений:

ДСР – динамическое светорассеяние;

ИК – инфракрасный;

МТТ-тест — это лабораторный колориметрический тест на основе метилтиазолилтетразолия;

МС – меркаптид серебра;

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия;

СЭМ – сканирующая электронная спектроскопия;

УФ – ультрафиолетовый;

ЦСР – цистеин-серебряный раствор;

GSH – глутатион;

HaCaT – спонтанно анеуплоидную бессмертную клеточную линию (иммортиализованные) кератиноцитов взрослого человека, полученных из нормального эпидермиса;

MCF-7 – эпителиоподобные клетки, выделенные из инвазивной аденокарциномы молочной железы женщины;

SiHa – клетки карциномы плоскоклеточного рака шейки матки человека;

Wi-38 – диплоидные фибробласты, выделенные из легочной ткани нормального эмбриона человека.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время приоритетным научным направлением является создание и исследование свойств «наноразмерных» молекулярных и супрамолекулярных структур, состоящих из молекул, связанных в единую систему относительно слабыми межмолекулярными взаимодействиями [1-6]. Для фундаментальной науки гели представляют интерес как системы с различными формами структурной организации. Среди гелеобразующих систем особый интерес представляют такие, в которых структурирование происходит при низком содержании дисперсной фазы. Супрамолекулярные низкоконцентрированные гели в настоящий момент приобретают все больше внимания и имеют потенциальное применение во многих областях благодаря динамическому характеру нековалентных взаимодействий, образующих гель-сетку. Приспособляемость и придание определенных свойств становятся предпочтительным направлением в получении супрамолекулярного геля. В связи с этим возникает необходимость изучения процесса самоорганизации супрамолекулярных систем при получении гелей с заданными свойствами. Одной из таких интереснейших супрамолекулярных систем является сравнительно недавно открытый и исследуемый нами супрамолекулярный гель на основе водных растворов аминокислоты L-цистеина, нитрата серебра и инициатора гелеобразования электролита [7]. Получаемый гидрогель имеет супрамолекулярную пространственную сетку и является тиксотропной системой. Повышенный интерес к таким гидрогелям обусловлен тем, что они включают в себя биоактивные вещества с низким содержанием дисперсной фазы ($\sim 0,01$ %). В качестве инициаторов гелеобразования при этом используются соли биоактивных металлов: сульфаты, галогениды (хлориды, фториды) и др [8]. Изначально при смешивании двух водных низкоконцентрированных растворов L-цистеина и нитрата серебра образуется меркаптид серебра (МС), являющийся в растворе цвиттер-ионом. Затем в ходе процесса самоорганизации происходит взаимодействие молекул МС в растворе между собой с образованием супрамолекулярных цепей («созревание» раствора) в результате замещения в

тиольной группе цистеина иона водорода на ион серебра: $-\text{SH} \rightarrow -\text{SAg}$ [7]. Полное созревание раствора при комнатной температуре обычно происходит в течении нескольких часов и такой созревший раствор мы называем «цистеин-серебряным раствором» (ЦСР). Однако исследования кинетики процесса самоорганизации или «созревания» ЦСР, раскрывающего механизм и движущие силы этого явления, до сих пор не проводилось.

Поскольку «созревший» ЦСР является в большинстве случаев полиэлектролитной системой, т.к. содержит в своей структуре подвижные ионы (противоионы, заряженные группы цистеина – цвиттер-ионы), то введение в раствор различных электролитов может приводить к образованию пространственной гель-сетки. Вопрос о формировании пространственной сетки геля в ЦСР под действием различных электролитов остается малоизученным. Установлен лишь факт необходимого присутствия электролитов при гелеобразовании в ЦСР, но характер участия катионов и анионов электролита в формировании гель-сетки детально не изучен.

Ранее в работах, проводимых на базе кафедры физической химии под руководством профессора Пахомова П.М., было установлено, что супрамолекулярные гели можно получить с участием таких серосодержащих аминокислот, как L-цистеин и N-ацетил-L-цистеин. Необходимым условием процесса гелеобразования являлось наличие в химическом составе аминокислоты трех функциональных групп: тиольной, карбоксильной и аминогруппы. Таким требованиям удовлетворяет более сложная молекула глутатиона (трипептид – $\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}(\text{SH})-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{COOH}$), также имеющая в своем составе три указанные функциональные группы. Поэтому в настоящей работе предпринята попытка исследования процессов самоорганизации и гелеобразования в низкоконтрированном водном растворе глутатиона и нитрата серебра.

Явление гелеобразования свойственно не только для ЦСР, но также и для других систем N-ацетил-L-цистеина [9], глутатиона [10], аденина [11] и т.д. Имеются исследования о возможности взаимодействия водного раствора L-цистеина по тиольной группе с наночастицами серебра и золота [12,13], что

открывает дополнительные возможности для построения супрамолекулярных систем сложной архитектуры. А также встречаются исследования, где в качестве целевой доставки лекарств и быстром выявлении заболеваний могут быть использованы анион-чувствительные супрамолекулярные гели [5,13-17].

Проблема создания высокоэффективных лекарственных средств является чрезвычайно актуальной. Уже показано, что ЦСР и гели на его основе, благодаря присутствию ионов серебра проявляют великолепные бактерицидные свойства [7]. Поскольку в ЦСР для его желирования вводят различные катионы металлов, то представляет интерес проверка их присутствия на подавление раковых клеток в организме человека. Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, раковые заболевания являются одной из серьезных проблем современной медицины, решение которой является актуальной задачей в настоящее время. Наиболее распространенными типами онкологических заболеваний в мире являются рак легкого, молочной железы, толстой и прямой кишки. Именно поэтому в настоящей работе в качестве исследуемых раковых клеток для проведения МТТ-тестов были выбраны: MCF-7 – эпителиоподобные клетки, выделенные из инвазивной аденокарциномы молочной железы и SiHa – клетки карциномы плоскоклеточного рака шейки матки женщины. Для усиления антираковых свойств и расширения диапазона их воздействия в ЦСР и гель, как в матрицу, могут быть введены, конечно, и другие лекарственные средства, например, активное вещество краситель метиленовый синий.

Перечисленные направления исследований диссертационной работы указывают на ее актуальность.

Актуальность данной работы подтверждают полученный грант Минобрнауки РФ в рамках выполнения государственных работ в сфере научной деятельности, а также грант для молодых ученых «УМНИК»:

- проект № 4.1325.2014/К (2014-2016) выполнялся в рамках проектной части госзадания по теме «Новые функционализированные материалы широкого спектра действия на основе макро- и супрамолекулярных систем». Основное направление исследований было связано с физико-химическими

исследованиями и компьютерным моделированием процессов самоорганизации в супрамолекулярных системах (в частности, в цистеин-серебряных гидрогелях);

- грант по программе «УМНИК» «Разработка матрицы на основе биоактивных гидрогелей для создания широкого спектра лекарственных препаратов» (2014-2015 г.).

Степень разработанности темы исследования. Ранее на базе кафедры физической химии был открыт и синтезирован супрамолекулярный гидрогель на основе низкоконцентрированного водного раствора L-цистеина и солей серебра, обладающий тиксотропными свойствами. Сначала это были работы, посвященные исследованию возможности взаимодействия аминокислоты L-цистеина и нитрата серебра и тому, какие условия этому способствуют. Поскольку слабый гидрогель при небольшом механическом воздействии переходил в состояние раствора, то для оценки его прочности была предложена визуальная «пятибалльная шкала». Затем в диссертационной работе Спиридоновой В.М. «Супрамолекулярные гидрогели на основе L-цистеина и нитрата серебра: получение, структура и физико-химические свойства» была установлена зависимость предела текучести, модуля упругости и величины рН в ЦСР при добавлении некоторых электролитов, проведен анализ морфологии ЦСР и гидрогелей при добавлении электролитов. Позднее в диссертационной работе Барановой О.А. «Физико-химические аспекты самоорганизации супрамолекулярной системы на основе водного раствора L-цистеина и нитрата серебра» исследован процесс взаимодействия аминокислоты с нитратом серебра в широком диапазоне соотношений исходных компонентов для получения супрамолекулярных гелей на основе ЦСР. В указанных работах было установлено, что получаемые гидрогели проявляют высокую микробиологическую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий. В диссертационной работе Барановой О.В. исследована антимикробная активность, проявляемая синтезированными наночастицами серебра непосредственно в ЦСР. В работе Адамян А.Н. «Процессы самоорганизации в водных растворах L-цистеина с участием солей серебра, водорастворимых

полимеров и под воздействием облучения» исследуется более детально возможность получения не только самих гидрогелей, но и пленок на основе ЦСР при добавлении некоторых водорастворимых полимеров: ПВС (поливиниловый спирт), КМЦ (карбоксиметилцеллюлоза) и ПГ (полигуанидин). В результате автором установлена хорошая совместимость полимеров с ЦСР и получены пленочные бактерицидные материалы. Кроме того, установлено влияние УФ-излучения и дневного света на процесс гелеобразования. Основное отличие диссертационной работы Адамян А.Н. от ранее рассмотренных состояло в том, что в качестве соли серебра был взят не нитрат, а ацетат серебра. В диссертационной работе Перевозовой Т.В. «Супрамолекулярные системы на основе водных растворов L-цистеина, его производных и солей серебра» процессы гелеобразования исследовались уже с участием нитрита серебра – AgNO_2 . Автором установлена возможность гелеобразования на основе водных растворов нитрита серебра с L-цистеином и N-ацетил-L-цистеином. Исследование самоорганизации в ЦСР и гидрогелях на его основе осуществлялось также в совместных работах с теоретической группой П.В. Комарова. Для изучения процессов самоорганизации использовались методы квантовой химии, молекулярной динамики и мультимасштабное компьютерное моделирование. Результаты этих исследований включены в две кандидатские (П.О. Бабуркин и М.Д. Малышев) и одну докторскую диссертации (П.В. Комаров): Комаров Павел Вячеславович «Многомасштабное моделирование нанодисперсных полимерных систем», 2014; Бабуркин Павел Олегович «Мезомасштабное моделирование процессов самосборки в трехкомпонентных супрамолекулярных наносистемах», 2022 и Малышев Максим Дмитриевич «Моделирование сетчатых молекулярных систем различной химической природы», 2022.

Однако следует отметить, что детального исследования ЦСР и гелей, как полиэлектролитной системы, а также влияния на процесс гелеобразования как катиона, так и аниона вводимого электролита, не проводилось. Кроме того, в настоящей работе выполнены кинетические исследования процесса самоорганизации на стадии «созревания» ЦСР, что не было сделано ранее.

Предприняты попытки выяснения использования глутатиона для получения гелей и практического использования полученных новых супрамолекулярных гидрогелей в области биомедицины (для лечения раковых заболеваний).

Цель настоящей работы — комплексное физико-химическое исследование влияния электролитов на самоорганизацию и гелеобразование в водном цистеин-серебряном растворе (ЦСР), а также выяснение возможностей практического использования полученных растворов и гидрогелей на их основе.

Достижение поставленной цели потребовало решить следующий перечень взаимосвязанных задач:

1. Изучить процесс самоорганизации в ЦСР на основе водного раствора L-цистеина и нитрата серебра с помощью физико-химических методов, провести кинетические исследования механизма самоорганизации ЦСР, определив энергию активации и движущие силы данного процесса.
2. Установить концентрационные интервалы, необходимые для получения гидрогелей и выяснить роль катионов и анионов электролита в формировании пространственной сетки геля, а также их влияние на свойства получаемого гидрогеля.
3. Провести комплексное исследование структуры ЦСР и гидрогелей на его основе.
4. Проверить возможность процессов самоорганизации и гелеобразования в водных растворах на основе трипептида глутатиона (GSH) и нитрата серебра.
5. Исследовать биологическую активность ЦСР и гидрогелей на его основе по отношению к раковым клеткам карциномы молочной железы, а также определить их влияние на здоровые клетки организма.

Научная новизна работы заключается в том, что в ней впервые проведены кинетические исследования процесса самоорганизации («созревания») в ЦСР с помощью метода УФ-спектроскопии. Определена кажущаяся энергия активации данного процесса $E_a=90,0$ кДж/моль, свидетельствующая о донорно-акцепторном

взаимодействии при формировании супрамолекулярных цепей из молекул меркаптида серебра (МС).

Выявлены роль ионов электролита в формировании пространственной сетки геля и влияние заряда катиона металла в электролите на прочностные свойства получаемых гидрогелей; предложена схема формирования пространственной сетки геля.

Исследован механизм координирования металлов в гель-сетке, и установлено влияние заряда катиона металла на прочностные свойства получаемых гидрогелей. Предложена схема гелеобразования в ЦСР с участием ионов электролита.

Изучены процессы самоорганизации в ЦСР и гелеобразования при взаимодействии с электролитами с помощью метода кондуктометрии. Построены кинетические зависимости изменения электропроводности ЦСР в ходе процессов самоорганизации и гелеобразования при введении в раствор различных электролитов. Показано, что падение электропроводности в растворе и геле обусловлено встраиванием ионов в супрамолекулярные цепи и пространственную сетку геля.

Получены устойчивые, прозрачные, низкоконтрированные, водные растворы на основе восстановленной формы глутатиона и нитрата серебра, исследованы физико-химические свойства стабильных, а также нестабильных водных растворов $GSH/AgNO_3$, предположен механизм координирования трипептида и ионов серебра в стабильную во времени структуру.

Проведены микробиологические исследования влияния гидрогелей с различными катионами и анионами электролита на подавление роста раковых клеток и жизнеспособность здоровых клеток; установлено, что наибольшей активностью в подавлении роста раковых клеток обладают гидрогели с катионом меди.

Синтезированы трехкомпонентные гидрогели на основе ЦСР, электролита и дополнительно введенного активного вещества – красителя метиленового синего. Исследованы их свойства и строение. Доказана возможность применения гидрогелей на основе ЦСР в качестве матрицы-переносчика.

Теоретическая и практическая значимость работы. Установлен механизм протекания процесса самоорганизации в ЦСР при смешивании водных растворов L-цистеина и нитрата серебра с помощью прямых физико-химических методов и кинетических исследований, заключающийся в быстром формировании молекул МС и последующем их связывании в супрамолекулярные цепи за счет донорно-акцепторных взаимодействий.

Выяснено влияние различных электролитов (катионов металлов и анионов), вводимых в ЦСР, на прочностные и вязкостные свойства образующихся супрамолекулярных гелей. Определены концентрационные интервалы широкого спектра вводимых электролитов в ЦСР для направленного получения супрамолекулярных гидрогелей с необходимыми свойствами и их дальнейшего использования. На основе проведенных исследований ведется активный поиск аналогов L-цистеина для синтеза супрамолекулярных гидрогелей.

В практическом плане установлено, что ЦСР и некоторые композиции гидрогелей, помимо бактерицидных, способны проявлять противоопухолевые свойства, в частности, биологическую активность против клеток карциномы молочной железы, что может найти применение в биомедицине.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на комплексном применении современных физико-химических методов исследования: электронная просвечивающая и сканирующая микроскопия, энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, ИК-Фурье и УФ спектроскопия, динамическое светорассеяние (ДСР), вибрационная вискозиметрия, цитотоксические испытания на раковых клетках и др.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В процессе самоорганизации («созревания») ЦСР из молекул меркаптида (тиолята) серебра формируются супрамолекулярные цепи за счет образования комплексов с переносом заряда. Данный процесс происходит при оптимальном температурном диапазоне (25-30°C) и избытке ионов серебра (соотношение $Cys/AgNO_3 = 1:1.25$).

2. Рассчитанная кажущаяся энергия активации процесса самоорганизации в ЦСР свидетельствует о донорно-акцепторном взаимодействии между молекулами меркаптида серебра (МС) при формировании супрамолекулярных цепей.

3. При добавлении в ЦСР инициатора гелеобразования (электролита) происходит образование супрамолекулярной пространственной гель-сетки за счет связывания супрамолекулярных цепочек МС с помощью катионов и анионов электролита. Механизм гелеобразования, а, следовательно, и характер образующейся пространственной гель-сетки зависят от вводимого электролита. Получены прочные стабильный гидрогель с F⁻-анионом и трехкомпонентный гидрогель на основе ЦСР, CuSO₄ и метиленового синего.

4. Процесс самоорганизации глутатиона, в состав которого входит аминокислота L-цистеин, и нитрата серебра, происходит с заменой иона водорода на ион серебра в тиольной группе при определенном молярном соотношении (1:2,00 и 1:2,25) исходных компонентов (Глутатион/нитрат серебра). Схематично представлен механизм самоорганизации глутатиона и нитрата серебра.

5. Полученные композиции гидрогелей с катионами Cu²⁺, Na⁺, F⁻-анионом и смеси гидрогеля с метиленовым синим обладают высокой способностью к подавлению роста раковых клеток.

Личный вклад автора. Все основные результаты диссертации получены автором самостоятельно. Результаты исследования обсуждались с научным руководителем. Автор самостоятельно синтезировал и изучил условия получения ЦСР и гидрогелей на его основе с большим количеством электролитов, впервые получил устойчивые гидрогели с фторид-анионом, исследовал строение, физико-химические свойства образующихся гидрогелей. Автор впервые самостоятельно синтезировал новую систему на основе водных растворов глутатиона и нитрата серебра и исследовал процесс самоорганизации. Результаты, полученные с использованием различных физико-химических методов, осуществлялись совместно с соавторами опубликованных статей.

Достоверность и обоснованность результатов обеспечена анализом литературных данных, корректной постановкой исследовательских задач, комплексным применением современных методов регистрации и обработки экспериментальных данных, согласованностью результатов с исследованиями других авторов.

Апробация результатов работы. Основные результаты изложены в 16 публикациях, из них 14 в журналах, входящих в список рецензируемых журналов, рекомендованных ВАК и приравненных к ним, из которых 4 работы в изданиях, индексируемых в базах данных WoS и Scopus, и 1 патент РФ на изобретение. Полученные в диссертации результаты докладывались автором на 44 всероссийских и международных конференциях по профилю выполняющихся исследований. Исследования по теме диссертационной работы проводились при поддержке гранта Минобрнауки РФ в рамках выполнения государственных работ в сфере научной деятельности (проекты №4.1325.2014/К) и гранта по программе «УМНИК» (2014-2016 г.).

Основные результаты диссертационной работы представлялись и докладывались на: VI Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры - 2014» (Москва), VIII и IX Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии «Менделеев» (Санкт-Петербург, 2014-2015), XXVII, XXIX, XXX симпозиуме по реологии (Москва, Тверь, 2016, 2018, 2021), XXI-XXXI Каргинских чтениях с международным участием (Тверь, 2014-2025), XXVI, XXVIII Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2016, 2018), XX и XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург 2016, Санкт-Петербург 2019), XXIII, XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2016, 2018), Baltic Polymer Symposium (Латвия, 2018), XI, XIV, XVI Международной научной конференции «Химическая термодинамика и кинетика» (В. Новгород, Тверь, 2021, 2024, 2026), Международной научно-технической конференции молодых ученых «Инновационные материалы и технологии»

(Беларусь, 2023), XX международной научно-практической конференции «Новые полимерные композиционные материалы», Микитаевские чтения (Нальчик, 2024), XI Молодежной конференции ИОХ РАН (Москва, 2025), XVII Санкт-Петербургской конференции молодых ученых с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2025).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, основных результатов и выводов, списка литературы (включающего 212 наименований), а также списка опубликованных по теме диссертации работ. Диссертация содержит 161 страницу, включая 5 таблиц и 74 рисунка.

ГЛАВА 1. СТРУКТУРА И ПРОЦЕССЫ САМООРГАНИЗАЦИИ В СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ ЦИСТЕИН-СЕРЕБРЯНОГО РАСТВОРА И В СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ ГЛУТАТИОНА (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

1.1. Введение в супрамолекулярную химию: особенности и основные понятия

Супрамолекулярная химия – одна из наиболее популярных, стремительно развивающихся областей современной экспериментальной науки [18]. В блестящей монографии лауреата Нобелевской премии в области химии Жан-Мари Лена «Супрамолекулярная химия: Концепции и перспективы» (Новосибирск, 1998) изложены концептуальные проблемы супрамолекулярной химии. Все это время и до сегодняшнего момента развитие этой науки не стояло на месте. И, хотя, основные понятия в этой области не претерпели принципиальных изменений, но методы исследования, а также многочисленные объекты исследования существенно изменились. Супрамолекулярная химия в последние годы стала одной из наиболее интенсивно развивающихся областей науки и является приоритетным направлением благодаря широкому диапазону применения во многих областях жизненно важных отраслей промышленности. Впервые термин «супрамолекулярной химии» был введен в 1998 г., в монографии Ж.-М. Лена дано следующее определение:

Супрамолекулярная химия – химия молекулярных ансамблей и межмолекулярных связей, описывающая сложные образования, которые являются результатом ассоциации двух или более химических частиц, связанных вместе межмолекулярными силами [19]. В частности, специалисты, работающие в этой области, выбрали несколько иное определение супрамолекулярной химии – как науки, изучающей группу молекулярных компонентов, индивидуальные свойства которых интегрированы в свойства целого ансамбля (нековалентного или ковалентного) [18].

Современное определение супрамолекулярной или надмолекулярной химии в связи со стремительным развитием данной области науки и синергетикой с другими областями (такими как физика, биохимия, медицина и т.д.) звучит

несколько иначе — это междисциплинарная область науки, включающая физические, химические и биологические аспекты рассмотрения более сложных, чем молекулы, химических систем, связанных в единое целое посредством межмолекулярных нековалентных взаимодействий [20]. Объектами супрамолекулярной химии принято считать супрамолекулярные ансамбли, строящиеся самопроизвольно из комплементарных, т.е. имеющих геометрическое и химическое соответствие, фрагментов, подобно самопроизвольной сборке сложнейших пространственных структур в живой клетке. Сравнение с живой природой следовало ожидать, учитывая разнообразие структуры и функций, преобладающих в биологической среде, которое в большинстве случаев происходит благодаря нековалентной структуре. Таким образом, воспроизведение биологии с помощью разработанных синтетических систем и вмешательство в биологические системы следует рассматривать как главную цель в супрамолекулярной химии на пути к конечной цели создания функциональной архитектуры, не встречающейся в природе. Супрамолекулярная медицинская химия и химическая биология — описывает прогресс, достигнутый в использовании всех коллективных знаний о супрамолекулярной химии для вмешательства в биологические системы и управления поведением материалов посредством понимания нековалентной химии для достижения терапевтической или диагностической пользы [21].

Для удобства сравнения молекулярной и супрамолекулярной химии можно представить преобразование одной в другую в виде схемы, в которой вначале молекулярные прекурсоры (предшественники) взаимодействуют между собой, образуя ковалентную молекулу, что попадает под разряд молекулярной химии; затем ковалентная молекула, предстающая в виде «молекулы-хозяина», вступает во взаимодействие с «молекулой-гостем». Обычно в роли «молекулы-хозяина» выступает большая молекула или агрегат, который формально можно представить как молекулярное образование со сходящимися центрами связывания (например, донорные атомы оснований Льюиса, доноры водородной связи и т.д.), а в роли «гостя» - моноатомный катион, простой неорганический анион или более сложная

молекула, он обладает расходящимися центрами связывания (например, сферический катион металла кислоты Льюиса или галогенид-анион в качестве акцептора донорной связи) [22]. В результате происходит взаимодействие «гость-хозяин», что приводит к образованию комплекса [22] (в некоторых источниках, называемого «супрамолекулой»), обладающего специфическими характеристиками, межмолекулярными взаимодействиями и степенью упорядоченности. С образованием «супрамолекулы» происходит переход молекулярной химии в супрамолекулярную (рис.1.1). Подобный механизм описан в монографии Ж.-М. Лена [18].

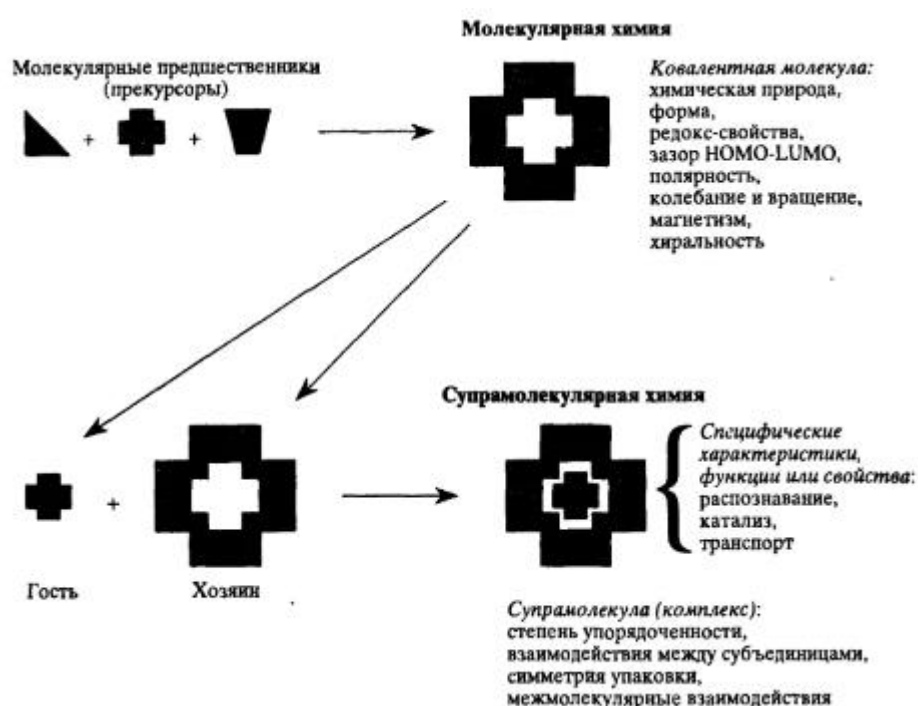


Рис.1.1. Сравнение молекулярной и супрамолекулярной химии по теории Ж.-М. Лена [18]

Многие «молекулы-хозяева» в супрамолекулярной химии конструируются за счет множественных взаимодействий. Это означает, что можно осуществить взаимодействие «хозяин-гость» за счет нековалентных слабых взаимодействий, которые способны стабилизировать комплекс. Во многих случаях взаимодействия во всей системе бывают синергетически сильнее, чем суммарно все взаимодействия ее компонентов. Такая дополнительная стабилизация основана на хелатном и макроциклическом эффекте [20].

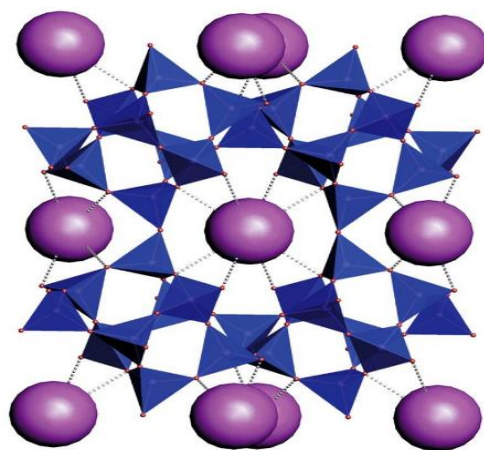


Figure 23-52
 Shriver & Atkins Inorganic Chemistry, Fourth Edition
 © 2006 by D. F. Shriver, P. W. Atkins, T. L. Overton, J. P. Rourke, M. T. Weller, and F. A. Armstrong

Рис. 1.2. Соединение типа «хозяин-гость» в супрамолекулярных структурах [23]

Хелатный эффект выражается в значительно большей устойчивости комплексов бидентантных лигандов, которые по устойчивости близки к металлокомплексам. В супрамолекулярной химии термодинамическую устойчивость комплекса «хозяин-гость» (рис. 1.2) можно повысить как раз действием хелатного эффекта [20]. Это можно сделать за счет того, что донорные атомы лиганда-хозяина любой природы являются центрами связывания, а металл, в роли которого могут выступать катионы металлов, - гостем. В качестве «гостя» также могут выступать и анионы, и даже нейтральные частицы. Однако, стабилизация, обусловленная только за счет хелатного эффекта, подчас зависит от размеров самого хелатного кольца. Например, пятичленные кольца, такие как в металлокомплексе этилендиамина, часто наиболее устойчивы, поскольку слабее всего сопряжены. Кроме того, энергия сопряжения хелатного цикла зависит и от размера катиона металла. Многие комплексы «хозяин-гость» более устойчивы, чем это может осуществить только хелатный эффект. Такие соединения дополнительно стабилизированы макроциклическим эффектом. В этом случае «молекулы-хозяева» в таких образованиях обычно макроциклические лиганды, хелатирующие «гостя» посредством определенного числа связывающих центров. Такой эффект обусловлен не только хелатированием «гостя» посредством центров связывания «хозяина», но и организацией этих центров в пространстве [22,19]. Согласно терминологии супрамолекулярной химии, термины «соединение включения» и соединение комплекса типа «гость-хозяин» характеризуют соединения,

существующие в твердом состоянии и относящиеся к твердым супрамолекулярным ансамблям. Во всех других случаях в качестве понятия «хозяин» принято понимать «рецептор», а в качестве «гостя» - «субстрат». Так, П. Эрлих в 1906 г. [24] фактически ввел понятия «рецептора» и «субстрата», однако, он отмечал, что эти молекулы не взаимодействуют между собой, если предварительно они не вступили в определенную связь, но при этом связывание должно быть селективным. Это же подчеркивал и Э. Фишер [25] в 1894 г. Он предположил, что в основе молекулярного распознавания лежит стерическая и геометрическая комплементарность [25]. Такая селективность требует взаимодействия и некоторого сродства между двумя участниками. Основу этой идеи высказал в своих трудах А. Винер [26], что делает супрамолекулярную химию в этом обобщенном отношении координационной химией. Ж.-М. Лен считал, что эти три понятия – связывание, распознавание и координация – и заложили фундамент супрамолекулярной химии [27].

Выборочное связывание определенного «субстрата» и «рецептора» в результате процесса молекулярного распознавания приводит также, как и в твердофазной супрамолекулярной химии, к образованию «супрамолекулы». Термин «супрамолекула» был введен уже в 30-е гг. двадцатого столетия, и использовался для описания более сложного уровня организации, возникающего из-за ассоциации координационно насыщенных молекул [26]. Кроме того, если в рецепторе помимо центров связывания присутствуют еще и реакционноспособные функциональные группы, то он может выступать в качестве катализатора и влиять на связанный с ним субстрат [28]. В биохимии, например, липофильный рецептор, растворимый в мембранах, может становиться носителем и переносить связанный с ним субстрат, осуществляя тем самым необходимую функцию организма. Исходя из этого, можно сделать вывод, что молекулярное связывание, распознавание, превращение и перенос – являются основными функциями супрамолекулярных объектов.

В качестве «рецепторов» могут выступать: кавитанды, криптанды, калексарены.

Кавитанды - макроциклические соединения, содержащие полость из напряженной вогнутой поверхности, способной охватывать комплементарные молекулы и ионы [28].

Криптанды – макроциклические соединения, состоящих из двух и более циклов и являющиеся полидентатными лигандами в комплексах с катионами металлов. Впервые они были изучены Ж.-М. Леном в 1969 г., узловыми атомами (общими атомами для всех макроциклов) в них могут выступать углерод или азот, атомами в составе циклов — кислород, сера или азот [29].

Каликсарены (рис. 1.3) - макроциклические соединения, продукты циклической олигомеризации фенола с формальдегидом [30].

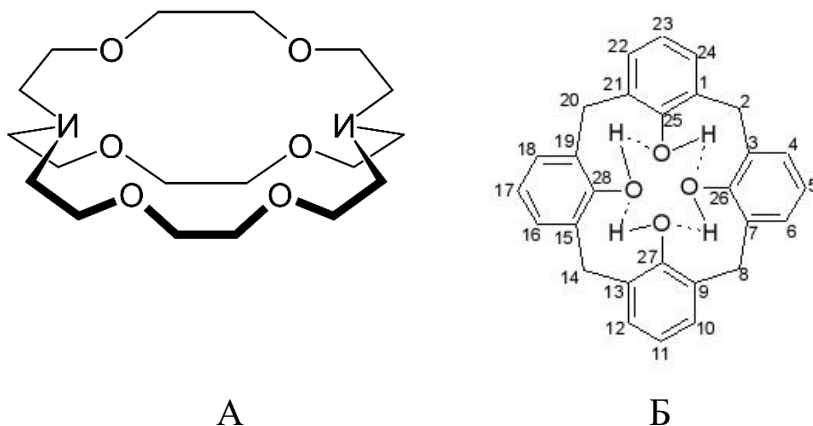


Рис. 1.3. Криптан (а) [29] и каликсарен (б) [30]

Супрамолекулярную химию, согласно Ж.-М. Лену [18], формально можно разделить на две частично взаимосвязанные части:

- 1) Супрамолекулы – олигомолекулярные образования, возникающие за счет межмолекулярных взаимодействий нескольких компонентов (хозяин-гость или рецептор-субстрат) и, при необходимости, работающей по принципу молекулярного распознавания.
- 2) Супрамолекулярные ансамбли – полимолекулярные ассоциаты, возникающие в результате спонтанной ассоциации неопределенного (большого) числа компонентов в специфическую фазу, которая характеризуется более-менее определенной организацией на микроскопическом уровне и макроскопическими свойствами, зависящими от природы.

В качестве супрамолекулярных ансамблей может выступать мембрана, пленка, слой, мезоморфная фаза, кристалл, мицелла и т.д. [28,29]. К супрамолекулам же, кроме соединения «хозяин-гость», можно причислить такие класс химических соединений как ротаксаны и катенаны. Единственная разница у них в том, что компоненты катенанов и ротаксанов связаны чисто механически, без участия химической связи [31].

Супрамолекулярные ансамбли могут быть охарактеризованы «супраструктурой», расположением компонентов в пространстве, их архитектурой (координированием) и типами связывания компонентов в пространстве между собой. Исходя из этого, супрамолекулярные ансамбли обладают определенными структурными, термодинамическими, конформационными, кинетическими и динамическими свойствами. А, учитывая размер таких сложных образований, как супрамолекулярные ансамбли, вполне очевидно, что в них могут встречаться различные типы взаимодействий: различающиеся по силе, направленности, зависимостью от расстояний и углов (координационные взаимодействия с ионами металлов, электростатические силы, водородные связи, силы ван-дер-ваальса, донорно-акцепторные взаимодействия и т.д.). Сила таких взаимодействий может варьироваться от слабых водородных взаимодействий до очень сильных координационных с катионом металла [26]. Однако, в основном межмолекулярные взаимодействия слабее, чем ковалентные связи, поэтому супрамолекулярные ассоциаты по сравнению с молекулой менее стабильны термодинамически, но более лабильны кинетически и гибки динамически [18,21,28-30].

Исследовательские цели супрамолекулярной химии включают изучение большого ряда классов молекул: рассматривают конструкцию и разработку металлоциклов и металлолаков с помощью химической координации металло-лигандов; наноуглероды, такие как нанотрубки, графен и фуллерены, и их сверхструктурированные сборки; особое внимание уделяется галогенным связям и их особой роли в супрамолекулярном структурировании; самосборки «металл-лиганд» [32], реагирующие на стимулы; биомедицинские применения супрамолекулярных систем, основанных на взаимодействиях хозяин-гость. Одной

из новых областей исследований, интегрирующих супрамолекулярную химию с аналитической химией, является супрамолекулярная аналитическая химия. Она в основном сосредоточена на создании и применении датчиков [32]. Всего за 50 лет существования дисциплины супрамолекулярная химия широко исследовалась в различных областях, включая следующие: молекулярные машины, молекулярные датчики, поглощение газа, нанореакторы, химический катализ и доставка лекарств. Таким образом, супрамолекулярная химия является перекрестной дисциплиной органической химии, физической химии, координационной химии, полимерной химии, материаловедения, биологической науки и т.д.

Последние достижения в супрамолекулярной химии и наиболее перспективные ее направления связаны с исследованием процессов молекулярного распознавания и образования новых структур за счет так называемых процессов «самосборки» [18, 33, 34, 35]. Сами же понятия «самосборки» и «самоорганизации» были введены в супрамолекулярную химию Ж.-М. Леном в ходе изучения спонтанного образования неорганических комплексов. В супрамолекулярной химии «самоорганизация» означает своего рода процесс спонтанной генерации определенной супрамолекулярной структуры при заданных условиях из отдельных составных компонентов [18]. Согласно Ж.-М. Лену [18], «самосборка» и «самоорганизация» означают два разных, но частично перекликающихся класса явлений. Причем «самосборка» является более широким термином, чем «самоорганизация». Так, процесс «Супрамолекулярной самосборки» заключается в спонтанной ассоциации как минимум двух или более компонентов, приводящей к образованию или дискретных супермолекул, или протяженных полимолекулярных ансамблей (молекулярные слои, пленки и т.д.). При этом, процесс ассоциации происходит за счет нековалентных взаимодействий [18, 36].

Процесс же «самоорганизации» Ж.-М. Лен определяет, как упорядоченную самоассоциацию, которая:

- включает системы, в которых возможно спонтанное возникновение порядка в пространстве и/или во времени;

- охватывает пространственный (структурный) и временной (динамический) порядок;
- затрагивает только супрамолекулярный (нековалентный) уровень;
- является многокомпонентной системой [26].

Исходя из этого определения, «самоорганизация» представляет собой взаимодействие, обуславливающее коллективное поведение всех происходящих в этот момент процессов [18, 35]. «Самоорганизация» может происходить в растворе, в жидкокристаллической фазе или твердом состоянии, причем в качестве основных взаимодействий между компонентами используются водородные

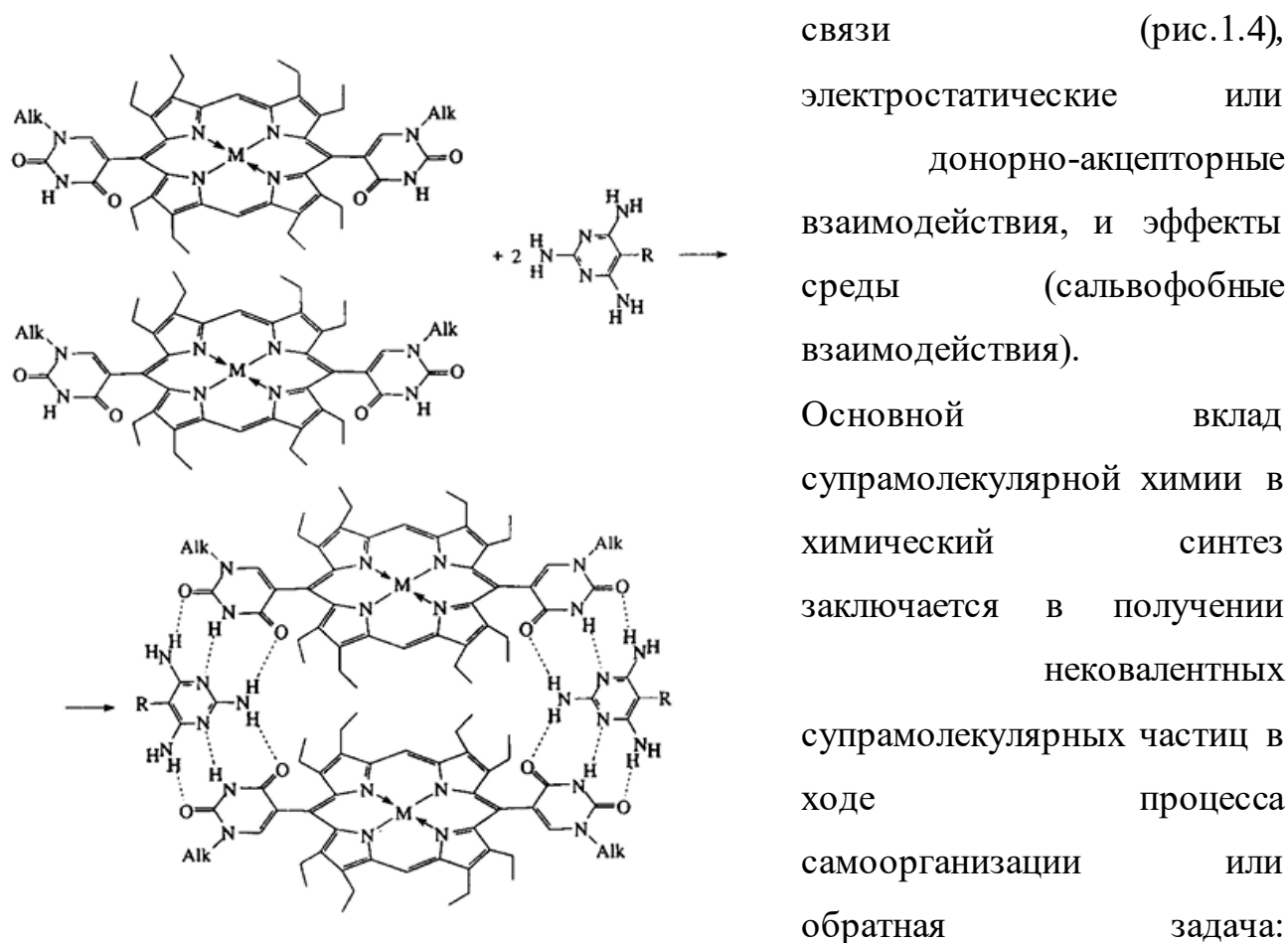


Рис.1.4. Процесс самоорганизации 2,4,6-триамино-5-алкилпиримидинов с участием межмолекулярных водородных связей [26]

особенностей для помощи в синтезе нековалентных молекулярных структур [18]. Собственно, в этом и состоит смысл супрамолекулярного синтеза – в образовании супрамолекулярных структур посредством направленных межмолекулярных сил. Любой супрамолекулярный

синтез сложных структур возможен при наличии контроля процесса на молекулярном уровне [26]. В результате супрамолекулярная химия может быть использована для нужного расположения (координирования) компонентов в структуре в ходе процесса самоорганизации. Это открывает новые возможности в области синтеза сложных систем.

Говоря об особенностях супрамолекулярной химии, следует отметить, что важную роль в этой науке играют детальные структурные данные [26]. Без подробного изучения процессов структурирования невозможно создание новых классов веществ и их дальнейшего применения, и здесь решающую роль играет развитие и применение современных методов исследования структуры и свойств (ИК-, УФ- и особенно ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, рентгеновская дифракция, просвечивающая и сканирующая микроскопия), позволяющие изучать даже лабильные супрамолекулярные ансамбли, характеризующиеся низкоэнергетическими нековалентными взаимодействиями.

1.2. Степень разработанности темы исследования: изучение систем на основе низкомолекулярных аминокислот и нитрата серебра и их отличия

Процессы самоорганизации в ЦСР исследовались ранее на кафедре физической химии Тверского государственного университета (под руководством профессора Пахомова П.М.). Изначально это были «пионерские» работы, посвященные исследованию возможности взаимодействия аминокислоты L-цистеина и нитрата серебра и тому, какие условия этому способствуют. Так, например, в диссертационной работе Барановой О.А. «Физико-химические аспекты самоорганизации супрамолекулярной системы на основе водного раствора L-цистеина и нитрата серебра» исследован процесс взаимодействия аминокислоты L-цистеин и нитрата серебра в широком спектре соотношений и установлен концентрационный диапазон наиболее стабильного соотношения [37]. Это дало возможность существенно продвинуться в изучении системы ЦСР, т.к. данное соотношение легло в основу всех дальнейших исследовательских работ. Позднее в

диссертационной работе Спиридоновой В.М. «Супрамолекулярные гидрогели на основе L-цистеина и нитрата серебра: получение, структура и физико-химические свойства» была установлена зависимость влияния изменения температуры на процесс формирования ЦСР и гидрогелей на его основе [8]. В этих работах установлено, что получаемые гидрогели обладали тиксотропными свойствами и проявляли микробиологическую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий: в диссертационной работе Барановой О.В. исследована антимикробная активность, проявляемая синтезированными наночастицами серебра, которые добавляли в ЦСР, а в диссертационной работе Спиридоновой В.М. – исследованы антибактериальные свойства и подавление роста тест-культур ЦСР и гидрогелями с некоторыми электролитами (NaWO_4 , NaMoO_4 , NH_4Cl , Na_2SO_3 +ПВС, цефатоксин). Ранее было обнаружено, что при взаимодействии ЦСР с полимерами, например, ПВС (поливиниловый спирт), также образуется гель [38]. В работе Адамян А.Н. «Процессы самоорганизации в водных растворах L-цистеина с участием солей серебра, водорастворимых полимеров и под воздействием облучения» исследуется более детально возможность получения не только гидрогелей, но и пленок на основе ЦСР с некоторыми водорастворимыми полимерами: ПВС, КМЦ (карбоксиметилцеллюлоза) и ПГ (полигуанидин). В результате автором установлена хорошая совместимость полимеров с ЦСР и получены прочные пленки [38]. Механизм совмещения ЦСР с полимерами идентичен механизму внесения в ЦСР электролитов - после созревания раствора. Кроме того, было установлено влияние УФ излучения и дневного света на процесс гелеобразования, однако, замена H_2O на D_2O не принесла существенного изменения в структуре гидрогеля. Главное отличие данной диссертационной работы Адамян А.Н. состоит в том, что в качестве соли серебра взят не нитрат, а ацетат серебра. В диссертационной работе Перевозовой Т.В. «Супрамолекулярные системы на основе водных растворов L-цистеина, его производных и солей серебра» также процессы гелеобразования исследовались на основе другой соли серебра – AgNO_2 [9]. Автором установлена возможность взаимодействия гелеобразования на основе водных растворов нитрита серебра и L-цистеина, N-

ацетил-L-цистеина, меркаптопропионовой кислоты (МПК) и цистеамин. Выбор данных соединений связан с отсутствием в МПК и цистеамине карбоксильной группы, и попыткой понять механизм, связанный с этим.

Исследование самоорганизации в ЦСР и гидрогелях на его основе осуществлялось также в совместных работах с теоретической группой П.В. Комарова. Для изучения процессов самоорганизации использовались методы квантовой химии, молекулярной динамики и мультимасштабное компьютерное моделирование. Результаты этих исследований включены в две кандидатские (П.О. Бабуркин и М.Д. Малышев) и одну докторскую диссертации (П.В. Комаров): Комаров Павел Вячеславович «Многомасштабное моделирование нанодисперсных полимерных систем», 2014; Бабуркин Павел Олегович «Мезомасштабное моделирование процессов самосборки в трехкомпонентных супрамолекулярных наносистемах», 2022 и Малышев Максим Дмитриевич «Моделирование сетчатых молекулярных систем различной химической природы», 2022.

Результаты ранних совместных исследований представлены в монографии [7], а недавние исследования в работах [39-43].

Однако, детального исследования ЦСР как полиэлектролитной системы, влияния на процесс гелеобразования как катиона, так и аниона, а также кинетического изучения процесса самоорганизации на стадии «созревания» ЦСР не проводилось.

1.3. Классификация, особенности строения и синтеза гелей

Изначально, для описания гелеобразных систем использовалось понятие «студни», в широком смысле обозначающее - структурированные системы, состоящие из жидкости, заключенной в каркас из высокомолекулярных соединений. Именно этот каркас придает студню его форму и структуру. Термин "студни" как гелеобразные системы в настоящее время часто заменяется более общим понятием "гели" [44]. Основное отличие двух этих понятий заключается в природе связей и способности к восстановлению структуры. Так, студни – это

гомогенные системы, в которых нет видимой границы между фазами, и структура может восстанавливаться после разрушения. Исходя из этой характеристики, гели – гетерогенные или дисперсные системы, благодаря которым обладают более прочным каркасом, зачастую невосстанавливаемым [44]. Гели (от лат. *gelo* – «застываю») – структурированные системы, состоящие из низко- и высокомолекулярных веществ. Благодаря трехмерному полимерному каркасу (или по-другому «гель-сетки») гели обладают механическими свойствами твердых тел, а именно: отсутствие текучести, прочность, способность сохранять форму, а также способность к деформации, которая обуславливает их пластичность и упругость. По своей структуре гели состоят, по крайней мере, из двух компонентов, один из которых образует непрерывную пространственную трехмерную сетку, выступающую в роли каркаса, а другой – дисперсионную среду, заполняющую пустоты низкомолекулярным растворителем. В качестве низкомолекулярной дисперсной фазы могут выступать вода (гидрогели), низшие моно- и олигоспирты (алкогели) и углеводороды (органо- или лиогели) [2,3,44]. Такие гели, как органогели [2,3] или гидрогели [4,5,6,45], представляют собой мягкие материалы, имеющие первостепенное значение в биомедицине и здравоохранении [4,5,46-49]. Можно предположить два метода получения таких биоматериалов [50]: макромолекулярный [51,52] и супрамолекулярный [53,54,55]. В первом случае гель основан на химической сшивке, а во втором – на физическом механизме, обусловленном нековалентными взаимодействиями. Физико-химические свойства гелей определяются молекулярными взаимодействиями (ковалентными или нековалентными взаимодействиями), происходящими между составляющими их строительными блоками [56,57]. Супрамолекулярные полимерные гели представляют собой точно спроектированные физические гели, которые состоят из полимеров и объединены нековалентными взаимодействиями с образованием трехмерных сетчатых макромолекул [58,59,60]. Кроме того, в качестве желирующего агента могут выступать биополимеры [61]. Использование молекулярных конформаций для формирования структур более высокого порядка и претерпевание изменений в ответ на тонкие возмущения в их сигналах

окружающей среды повсеместно распространено в биополимерах, таких как коллаген, нуклеиновые кислоты. Учитывая уникальные функциональные возможности, которые предлагают такие системы, обширные исследования были посвящены разработке искусственных макромолекул с аналогичными функциями [62–65]. Полимерные гидрогели, сшитая сеть макромолекул, которых претерпевают обратимые фазовые переходы в ответ на тонкие изменения в их среде, являются одними из ранних примеров таких систем [66,67]. Гидрогели, реагирующие на воздействия извне, демонстрируют фазовые переходы в ответ на эти внешние и внутренние изменения среды, такие как температура, pH, электрическое поле, магнитное поле, свет и «химические триггеры» [68–73]. Объемные/фазовые переходы, реагирующие на воздействия такого рода, в основном контролируются взаимодействиями полимер–полимер и полимер–растворитель. Образующаяся в результате химическая структура гель-сетки играет ключевую роль во влиянии на природу, степень и динамику этих межмолекулярных взаимодействий и, таким образом, на чувствительность гидрогелей к подобным стимулам извне. Например, гидрогели, которые проявляют термообратимые свойства, часто состоят из молекулярных фрагментов, демонстрирующих баланс гидрофильных и гидрофобных взаимодействий [68,74]. Помимо объемно-фазовых переходов, молекулы с оптимальными гидрофильными и гидрофобными взаимодействиями были использованы для наделения химически сшитых гидрогелей уникальными функциями, такими как макроскопическая самоорганизация (от твердого тела до полого внутреннего пространства и от листа до трехмерных структур), память формы и самовосстановление [57,75,76].

1.4. Исследование гидрогелей как супрамолекулярных систем

Супрамолекулярные гидрогели представляют собой класс самоорганизующихся сетчатых структур, образующихся за счет нековалентных взаимодействий в гидрогелях. Эти гидрогели способны реагировать на внешние воздействия, и считаются «умными» материалами благодаря своей способности

претерпевать «золь-гель» и/или «гель-золь» переход при незначительных изменениях окружающей среды. Именно такие гидрогели представляют собой перспективные биоматериалы, находящие применение в тканевой инженерии, доставке клеток и лекарственных препаратов, регуляции тканевой среды для стимуляции естественного восстановления тканей, а также в медицинской диагностике. В частности, особое внимание уделяется различным структурным аспектам супрамолекулярных гидрогелей, участвующих в самоорганизации, роли внешних стимулов в настройке/контроле их фазовых переходов и возможностям использования этих функций для развития регенеративной медицины [1,4,6,14,49,77].

Подобно полимерным гидрогелям, супрамолекулярные гидрогели могут быть образованы путем сборки молекулярных строительных блоков, называемых инициаторами гелеобразования. Но в отличие от полимерных гелей супрамолекулярные гели или низкомолекулярные гели, состоящие из небольших молекул, также представляют собой интересный и полезный класс гелей, что подтверждают многочисленные исследования [1,4-6,11,14,17,49,64,78-82]. Хотя супрамолекулярные гидрогели имеют много функциональных сходств с обычными полимерными гидрогелями, формирование пространственной трехмерной сетки в супрамолекулярных гидрогелях отличается от гидрогелей на основе полимеров. Тогда как полимерные гидрогели часто образуются путем химического сшивания, супрамолекулярные гели образуются посредством нековалентных взаимодействий таких как: водородные связи (Н-связи), электростатические взаимодействия, π - π -взаимодействия [36], координация металл-лиганд [49], силы Ван-дер-Ваальса, что приводит к образованию сложных запутанных гель-сеток, заполненных водой [77], гидрофобные эффекты, которые позволяют небольшим молекулам обратимо собираться в структуры более высокого порядка, чаще всего в волокна или ленты, что приводит к образованию также трехмерной сетки [57,82,83,84], наполненной, например, водой [76], а в полимерных гелях – за счет химической сшивки [85,86]. Нековалентные взаимодействия по-отдельности слабы и являются обратимыми, однако, когда они работают вместе, может произойти устойчивая самоорганизация

[87]. Когда само-собирающиеся структуры образуют «сетку», удерживающую растворитель в своей структуре, образуются супрамолекулярные гели [84].

Подобно полимерным гидрогелям, супрамолекулярные гидрогели, образованные путем сборки молекулярных строительных «блоков», называемых инициаторами, также демонстрируют свойства, реагирующие на раздражители («золь-гель» или «гель-золь») [14,57,72,88]. Из-за того, что гель-сетки в гидрогелях образованы слабыми и обратимыми связями, образующимися за счет нековалентных сил в структуре геля, то подобные гели могут реагировать на внешние раздражители, такие как температура, pH (изменение кислотности среды) или дополнительно внесенные в гель ионы другого вещества, т.к. гели обычно подвергаются переходу из геля в золь при заданной температуре, pH или ионах [17,47,57,74,89,90-92]. Такая способность гелей может придавать им интересные механические свойства, такие как обратимое заживление [28,93,94,95]. Таким образом, в последнее десятилетие широкий интерес приобрели исследования в области супрамолекулярных гидрогелей, реагирующие на определенные внешние воздействия («внешние стимулы»), в основном из-за их применения в нано- и биотехнологиях [96,97,98]. Образование гель-сетки за счет нековалентных взаимодействий, обратимый золь-гель переход, химическая уникальность и способность изменяться под воздействием внешних стимуляторов – вот главные причины растущего интереса именно к супрамолекулярным гидрогелям. Подобные исследования привлекают все больше и больше внимания в области восстановления окружающей среды [4,27,73,99], биосенсоров [6,47,48,56,66,68,93,100,101], доставки лекарств [1, 5,11,14,15,49,50,64,67,74,79,102,103], фоточувствительных переключателей [47,52,100,104] и самовосстанавливающихся материалов [36,47,63,80,93,97 100,105-111].

К, так называемым, внешним «стимулам» относят прежде всего изменение температуры, Термочувствительные (рис.1.5 и рис.1.6) супрамолекулярные гидрогели могут претерпевать фазовые переходы «золь-гель» или «гель-золь» в ответ на незначительные изменения температуры окружающей среды,

обусловленные гидрофильными и гидрофобными взаимодействиями [14,57,73,74,96,112]. Например, гидрогели, демонстрирующие золь-гель переход при физиологической температуре (37 °C), очень привлекательны в тканевой инженерии в качестве каркасов и для доставки получаемых биомолекул

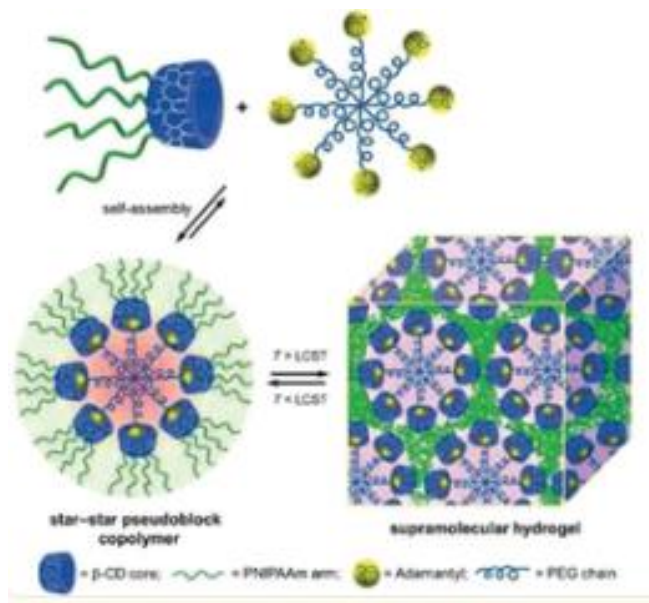


Рис.1.5. Формирование самоорганизующейся супрамолекулярной архитектуры посредством комплексообразования, включения в водном растворе и в результате образование супрамолекулярного гидрогеля при более низкой критической температуре растворения [96]

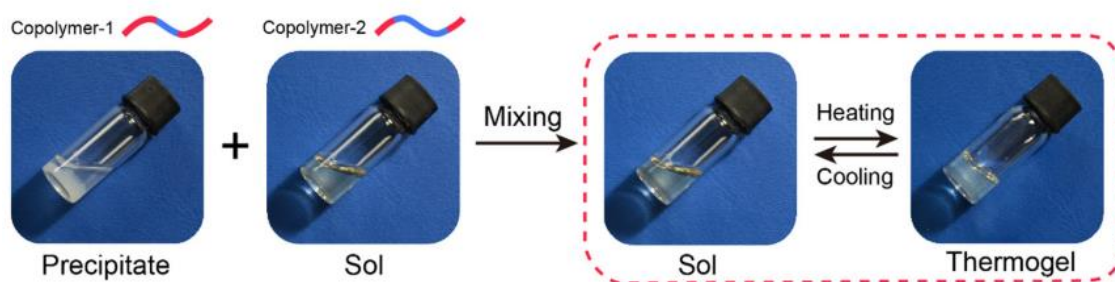


Рис.1.6. Обратимый золь-гель переход при изменении температуры [112]

Другим широко используемым физическим стимулом является свет, который использует инициаторы гелеобразования со светочувствительными группами (например, фоторасщепляемыми группами, фотоизомеризующимися группами), вследствие которых запускаются фазовые переходы [86,113]. Гидрогели, обладающие флуоресценцией (рис.1.7), могут потенциально использоваться для изучения поведения клеток с использованием фотошаблонированных каналов [114].

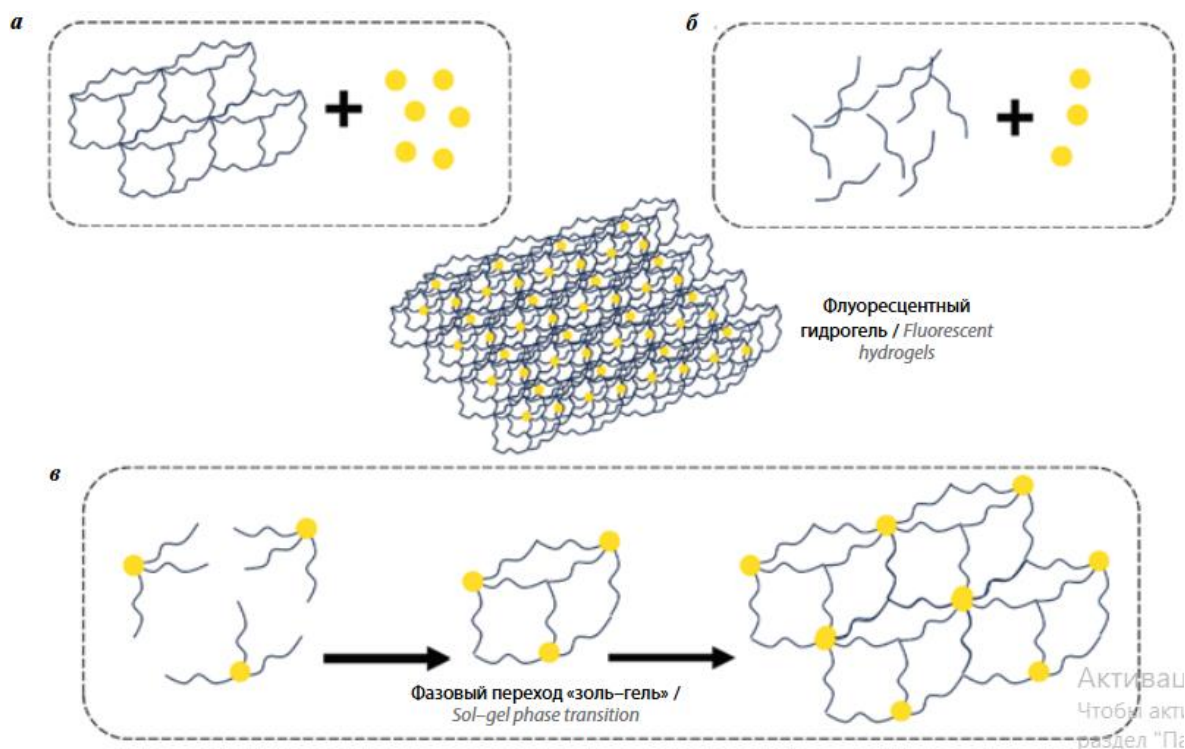


Рис.1.7. Способы получения флуоресцентных гидрогелей: а – внедрение флуоресцентных меток (ФМ) в готовый гидрогель (ГГ); б – внедрение ФМ в ГГ на этапе его полимеризации; в – внедрение ФМ в ГГ в ходе фазового перехода «золь–гель». Желтый круг – флуоресцентная метка; синяя линия – мономер для синтеза ГГ [114]

В дополнение к их использованию в качестве каркасов для инкапсуляции и культивирования клеток, светочувствительные супрамолекулярные гидрогели также исследуются для контролируемой доставки различных биомолекул, таких как витамины, лекарства и фототерапевтические агенты [98,113]. Хотя большинство светочувствительных биоматериалов фокусируются на УФ-свете в качестве триггера, применение УФ-чувствительных интеллектуальных материалов *in vivo* ограничено из-за их низкой проницаемости через ткани. В то время как фазовые переходы гидрогеляторов, вызванные как фотодеградацией, так и фотоизомеризацией, требуют использования высокоэнергетического УФ-излучения или видимого света, свет с меньшей энергией, такой как ближний инфракрасный (ИК) свет, также использовался для запуска фазового перехода супрамолекулярных гидрогелей. [57,112,113]

Другой вид физического воздействия на супрамолекулярные гидрогели – электрическое и магнитное поле. Разработка таких супрамолекулярных

гидрогелей, чувствительных к электрическому [6] и магнитному полю [115], основана на быстрой реакции и способности деформироваться под действием электрического поля. Для создания супрамолекулярных гидрогелей, чувствительных к магнитному полю, используются инициаторы гелеобразования с магнитно-активными центрами, такими как парамагнетики или диамагнетики (например, ионы металлов, ароматические фрагменты), которые образуют выровненные фибриллярные структуры в присутствии внешнего магнитного поля, а дальнейшее поддержание выровненной структуры достигается последующим изменением pH или добавлением дополнительно ионов [116].

Для формирования супрамолекулярных гидрогелей кроме низкомолекулярных инициаторов гелеобразования также используются полимерные инициаторы. В полимерных гидрогелях функциональные группы, которые присутствуют в макромолекулярных цепях, формируют супрамолекулярные сети за счет молекулярных взаимодействий между комплементарными парами в структуре [108]. Существует несколько обзорных статей, охватывающих структурные аспекты и потенциальное применение супрамолекулярных гидрогелей на основе либо малых молекулярных гидрогелей, либо полимерных гидрогелей [48,109,117,118]. Среди синтетических супрамолекулярных гидрогелей комплекс взаимодействия «хозяин-гость», который позволяет соединять два или более химических фрагментов вместе обратимым образом, широко используется для создания супрамолекулярных гидрогелей [119].

1.4.1. Исследование влияния катионов металлов низкомолекулярных солей на структуру и свойства образующихся гидрогелей

Исходя из выше сказанного, супрамолекулярные полимерные гели представляют собой физические гели, состоящие из полимеров, объединенных нековалентными взаимодействиями, образующих трехмерные сети макромолекул. В отличие от них, супрамолекулярные гели также являются интересным и широко

используемым классом гелей [17,120,110]. Подобные гели принято называть гели с низкой молекулярной массой (LMWG) [82]. Благодаря обратимости гели-сеток,



Рис.1.8. Самовосстанавливающиеся «золь-гель» и «гель-золь» переходы при воздействии внешних стимуляторов: температуры, света и механического встряхивания [100]

образованных нековалентными силами в структуре геля, эти гели могут реагировать на внешние воздействия (рис.1.8), такие как температура, изменение pH или добавление электролитов/ионов (гели обычно претерпевают обратимые гели/золь переходы при заданной температуре, pH

и др.), что придает гелям интересные механические свойства, такие как обратимое заживление [17,47,97,98,111].

Одним из внешних факторов, влияющих на свойства образующихся гидрогелей, безусловно, являются катионы металлов, входящих в состав электролитов. Благодаря силе комплексообразования катионы металлов могут координировать вокруг себя пространственную структуру геля [121]. Для гидрогелей, содержащих металлы в форме ионов, комплексных солей или частиц, часто используется термин «металлогель» (рис. 1.9). Другие термины для металлосодержащих гелей: координационный полимерный гидрогель, металлоорганический гель и металло-супрамолекулярный полимерный гель (МСПГ). МСПГ представляют собой подкласс полимерных сетей, образованных посредством физической агрегации, где связи между структурными компонентами (моно-, бидентатными, полидентатными лигандами и ионами металлов) обеспечиваются координационными связями. Количество новых металлосодержащих гелей растет, и этот интерес во многом обусловлен благодаря биомедицинскому применению гидрогелей в тканевой инженерии, доставке лекарств и лечении ран. Важными представителями металлосодержащих гидрогелей, имеющих биомедицинское применение, являются серебросодержащие гидрогели, используемые для дезинфекции кожи/ран. Антибактериальные свойства серебряных наночастиц изучались рядом микробиологов [122], которые

обнаружили многообещающую антимикробную активность серебряных наночастиц, сформированных *in situ* с использованием поли(метилвинилового эфира-альт-малеинового ангидрида) (PVM/MA), на различных микроорганизмах. Результаты подтвердили, что обработанные клетки *E. coli* были повреждены, что привело к образованию углублений на стенках бактериальных клеток. Недавно полимерные гидрогели, содержащие серебряные наночастицы, показали хорошую антибактериальную активность против *E. coli*. Установлено, что их антибактериальное действие зависит от количества наночастиц серебра в гидрогеле, количества AgNO_3 в растворе и сшивающего агента в гидрогелях. Описанные гидрогели авторы синтезируют методом свободнорадикальной водной сополимеризации, последующего добавления раствора соли серебра (AgNO_3) и восстановления NaBH_4 с получением наночастиц серебра, захваченных внутри геля [122].

Особое внимание привлекает комбинированное взаимодействие нескольких внешних факторов на структуру геля. Например, достижения в использовании супрамолекулярных гелеобразователей для изготовления полимероподобных физических гелей вдохновили ученых на разработку функциональных мягких материалов, в которых низкомолекулярные инициаторы гелеобразования содержат необходимые связанные ковалентными связями фрагменты, способствующие росту нековалентно-ассоциированных «строительных блоков» за счет процесса самоорганизации [123]. Однако, несмотря на то, что в последнее время исследование низкомолекулярных гелей находится в центре внимания, существует проблема в прогнозировании потенциальных гелеобразующих систем именно из-за сложных нековалентных взаимодействий между отдельными гелеобразователями [124]. Одним из решений данной проблемы стало исследование термоструктурирующихся желеобразных низкомолекулярных гелей как новых термочувствительных материалов [123]. Эта разработка основана на обратимой самоорганизации впервые созданного термотропного низкомолекулярного геля, которая

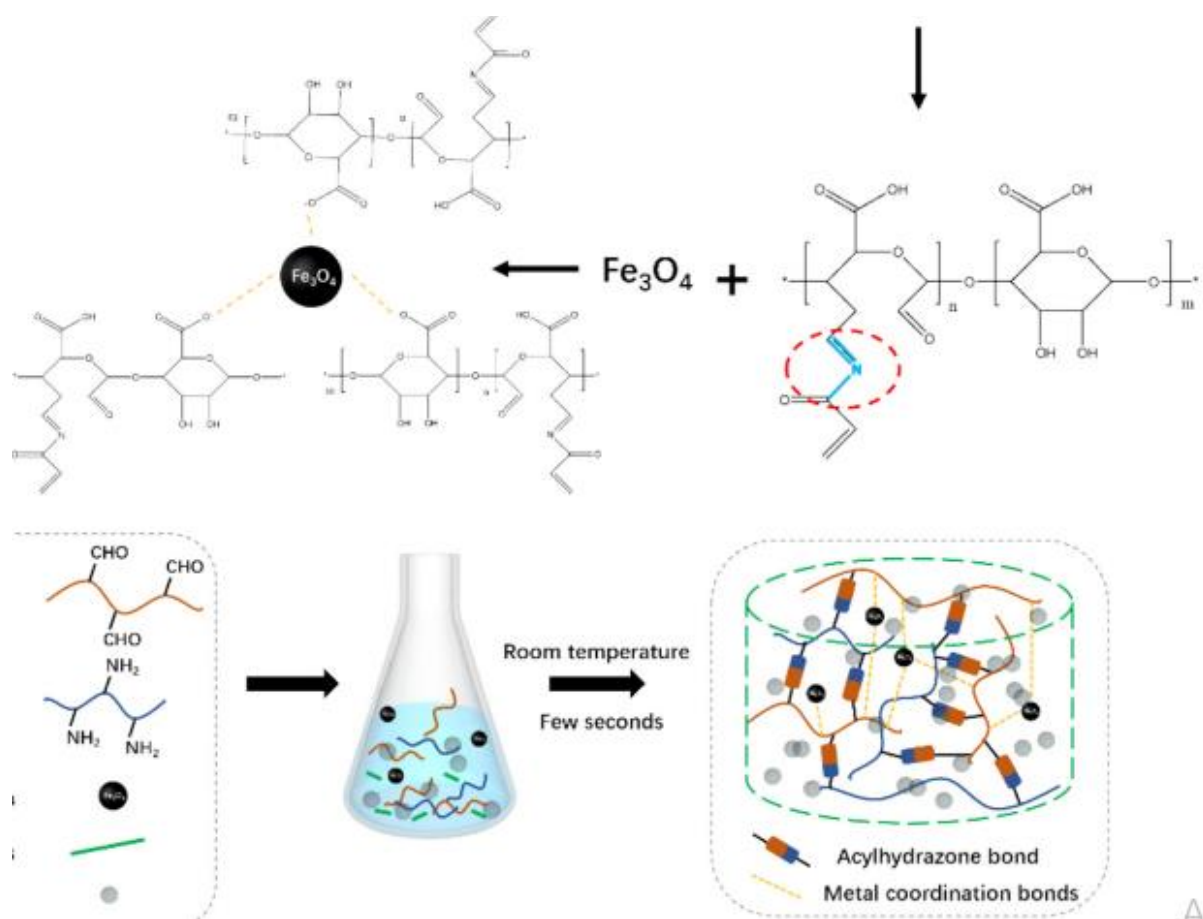


Рис.1.9. Создание ионного геля OSA-PAM-Fe₃O₄ с помощью простой обработки на основе ацилгидразонных связей и координационных связей металла [121]

контролируется энтальпией в отличие от известного энтропийного термофиксируемого процесса гелеобразования полимеров и белков [124].

Способность перестраиваться на молекулярном уровне повсеместно используется для изготовления пространственных трехмерных структур путем простой самоорганизации за счет слабых взаимодействий, сохраняемых супрамолекулярными гелями. Подобные взаимодействия осуществляются посредством введения катионов или анионов с последующим образованием геля. Именно они используются в качестве химического стимула для эффективного определения механизма самоорганизации во время гелеобразования. Использование катионов металлов в супрамолекулярных гелях (так называемые металлогели) в настоящий момент широко изучается. Во многом это происходит из-за способности катионов оказывать связывающее действие на супрамолекулярные гели за счет комплексообразующих свойств [50,108,125,126].

Например, металло-координационные связи широко используются в качестве динамических сшивающих агентов для создания самовосстанавливающихся гидрогелей. Однако, остаётся сложной задача повышения прочности металло-координированных гидрогелей без ущерба для эластичности и способности к самовосстановлению, поскольку все эти характеристики напрямую коррелируют с динамическими свойствами тех же металло-координационных связей. Подобная проблема рассматривается авторами статьи, посвященной созданию высокоэластичного быстро восстанавливающегося гидрогеля на основе координации аминокислоты гистидина с катионом металла Zn^{2+} [108]. В результате установлено, что координационное число катиона металла является важным параметром механической прочности получаемых гидрогелей. Увеличивая координационное число центра связывания, можно значительно повысить механическую прочность гидрогелей без ущерба для эластичности и способности к самовосстановлению, а регулируя концентрацию гистидина и Zn^{2+} , можно добиться достижения гидрогелями набора требуемых механических характеристик, включая модуль Юнга, деформацию разрушения, прочность и время самоорганизации [108]. Для сокращения времени самоорганизации и восстановления структуры геля в процесс добавляют оксид железа (Fe_3O_4), что значительно повышает механическую прочность и потенциальное применение геля [95]. Благодаря встраиванию катионов металлов в структуру геля, подобные системы приобретают определенные свойства, которые находят свое применение в медицине. Например, в качестве антимикробных гидрогелей на основе фенилаланина и лейцина при добавлении карбоната натрия, которые действуют как инициаторы гелеобразования и антимикробные агенты одновременно. Полученный антимикробный гидрогель проявляет селективную бактерицидную активность в отношении грамположительных бактерий, сохраняя при этом биосовместимость с нормальными клетками млекопитающих, что демонстрирует высокий потенциал в качестве антимикробного покрытия для клинического применения в противомикробной области [127]. Или, например, изготовление формовочной повязки для ран в результате синтеза биополимерных гидрогелей с

Ag^+ и аминокислотами *in situ* (на месте) [128]. Ионы серебра, благодаря антибактериальным свойствам, используются во многих исследованиях, например, специально разработанные многокомпонентные супрамолекулярные гидрогели серебра(I) в качестве мембранно-направленных антибактериальных средств широкого спектра действия против патогенов с множественной лекарственной устойчивостью [129].

Подавляющее большинство фибриллярных гелей представляют собой запутанную сеть самоорганизующихся волокон, по аналогии с полимером в хорошем растворителе. Однако, в некоторых редких случаях сочетание притягивающих ван-дер-ваальсовых и отталкивающих электростатических сил приводит к образованию пучков с супрафибрилярным гексагональным порядком. Так, например, недавно были проведены исследования [130], посвященные получению фибриллярных гидрогелей (рис.1.10), в ходе которых обнаружен неожиданный переход «мицелла-волокно». Данный переход авторы исследования инициировали ионами Ca^{2+} или Ag^+ , добавленными к мицеллярному раствору нового гликолипидного поверхностно-активного вещества. Данное исследование представляет интерес, потому что подобный механизм фибрилляции, индуцированной солью, нетипичен для поверхностно-активных веществ. В результате получаемый фибриллярный гидрогель имеет структуру «наносетки», характеризующуюся волокнистой сетью, состоящей как из переплетенных волокон.

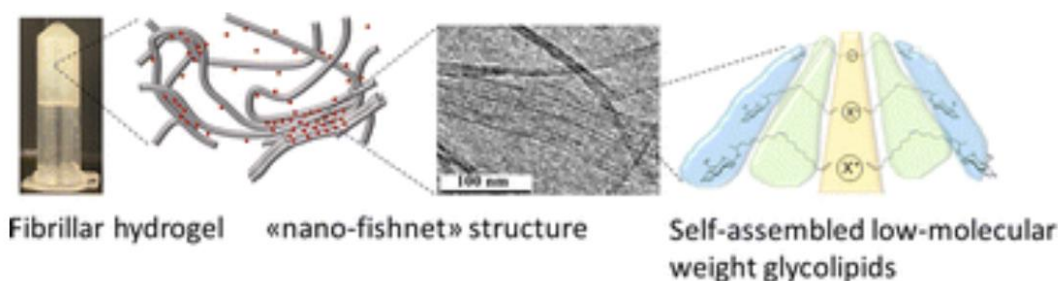


Рис. 1.10. Схема получения фибриллярного гидрогеля [130]

Кроме ионов Ag^+ , в качестве инициаторов гелеобразования используют катионы меди, алюминия, галлия [122]. В качестве ещё одного примера успешного

применения металлогелей в медицине можно привести исследование по получению мультибиофункциональных серебросодержащих металлосупрамолекулярных наногелей для эффективной антибактериальной терапии и селективной противораковой терапии [131]. В основе исследования лежит создание супрамолекулярной цепочки цитозин-серебро-цитозин (Cy-Ag-Cy), которая спонтанно самоорганизуется с образованием стерически стабилизированных сферических наногелей в воде. Интересно, что полученные наногели обладают рядом привлекательных особенностей, таких как уникальная способность флуоресценции в воде, высокостабильные самоорганизующиеся структуры в биологических средах, значительная антигемолитическая активность, высокая чувствительность к pH и широкий спектр антибактериальной активности против различных штаммов бактерий [131].

Также широко используются оксиды металлов. Например, наночастицы из оксидов металлов получили применение в биомедицинской области за счет способности целенаправленно достигать уникальных положений в организме. Так, внедрение наночастицы никелевого кобальтита (NiCo_2O_4) при внедрении полимерные гидрогелевые гранулы альгината натрия/гуммиарабика вызывают контролируемое высвобождение биоактивных агентов [132]. В результате подобные исследования показали, что такие гидрогелевые гранулы эффективно предотвращают рост клеток рака молочной железы. Или наночастицы оксида цинка, используемые в качестве гидрогелевых повязок, которые усиливают антибактериальную активность и способствуют лучшему заживлению ран [133].

Обзор современной научной литературы [134–136] показывает, что наиболее изученными являются наноструктурные гели на основе аминокислот — цистеина, лизина, лейцина и триптофана. Наряду с ними широкое распространение получили супрамолекулярные системы, формируемые широким спектром соединений: производными глюкозы, циклическими эфирами гидроксикислот (лактиды), гиалуронатом натрия, серебросодержащими солями бифосфоновых кислот и нитратом серебра, а также полимерными компонентами, такими как мицеллы ПАВ, полиакриловая кислота, S-нитрозоглутатион, полиангидриды и альгинат натрия. В

качестве структурирующего катиона во многих из приведенных гидрогелях используется катион серебра. Во многом благодаря именно ему получаемые гидрогели приобретают антибактериальные свойства и способны к ранозаживлению [122,132,137]. Таким образом, анализ литературных источников показал, что последние мировые исследования посвящены созданию гелеобразных супрамолекулярных систем, применимых в медицинской области, как, например, онкология (гидрогели, подавляющие рост раковых клеток), травматология (антибактериальные гидрогели или гидрогели, ускоряющие регенерацию ран), доставке лекарственных веществ в составе геля, и т.д.

Именно поэтому в гидрогелях, изучаемых в данной кандидатской работе, одним из исходных веществ является водный раствор нитрата серебра. Кроме того, в качестве инициаторов гелеобразования используются катионы металлов, которые являются биоактивными микроэлементами, участвуют в биохимических реакциях и способны проявлять антибактериальные и противомикробные свойства в составе получаемых гидрогелей.

1.4.2. Исследование влияния анионов низкомолекулярных солей на структуру и свойства образующихся гидрогелей

Помимо катионов важным участником гелеобразования являются также и анионы низкомолекулярных соединений. Использование анионов в качестве инициаторов гелеобразования представляет большой интерес за счет того, какие свойства гидрогели приобретают в результате этого взаимодействия. Подобные гидрогели можно использовать в окружающей среде, медицине и многих биологических процессах. Такими часто исследуемыми анионами, используемыми в области медицины и в биологических системах, являются анионы, входящие в ряд галогенов: I-Br-Cl-F. Например, использование иодидов может вызывать деполяризацию актиновых филаментов и переход из гелеобразного состояния в золь в результате воздействия иодид-аниона на гидратную оболочку [138]. Хлорид-анионы являются наиболее распространенными анионами во всех клетках

организма и играют важную роль в нейронной сигнализации [139], а также активации ферментативных реакций. Известно, что фторид-анион полезен для роста костей и здоровья зубов человека в небольшой концентрации, однако, избыток F^- -аниона может привести к серьезному заболеванию у человека – флюорозу – в результате влияния на биологические макромолекулярные системы (белки и желатиновые состояния) [118]. Кроме того, в сельском хозяйстве получили применение гидрогели с фосфат- и нитро-анионами.

Благодаря супрамолекулярной самоорганизации, запрограммированным свойствам и чувствительности к изменению внешних условий гидрогели, образованные анионами, стали одной из важнейших областей в изучении «мягких материалов» [90,140], т.е. материалов, способных к изменениям свойств. Анионы могут не только участвовать в гелеобразовании, но и, наоборот, разрушать процесс самоорганизации в супрамолекулярных структурах в результате нарушения межмолекулярных водородных связей в них. Поэтому такие свойства «анионных гелей» могут быть использованы для разработки контролируемых гелей или применяться в области их визуального обнаружения. Использование анионов в качестве инициаторов гелеобразования, не смотря на большой интерес к ним и активное исследование, изучено не полностью. В основном это происходит из-за того, что сложно провести взаимосвязь между образующимися пространственными структурами и функциональными свойствами гелей [118]. Анионы, являясь небольшими молекулами, взаимодействуют с супрамолекулярными гелями в результате нековалентных взаимодействий и специального реакционного центра. Обычно анионы как инициаторы гелеобразования состоят из трех частей: группу, участвующую в самоорганизации, линкер и функциональную группу (рис.1.11). В качестве группы, участвующей в самоорганизации, могут быть гидрофильные или гидрофобные группы, например, длинные алкильные цепи, производные аминокислот и др.) [90]. В качестве линкера часто используются амидные или мочевиновые связи, которые и способствуют образованию геля. Функциональная группа обычно обладает сродством аниона к супрамолекулярной структуре. Существует два типа

нековалентных взаимодействий между анионом и местом связывания в гелях из-за основных свойств анионов: электростатические взаимодействия с катионными центрами (в основном с катионами металлов, уже встроенными в супрамолекулярную структуру) и взаимодействия водородных связей с функциональными группами (гидроксил, мочевины, амидная и т.д.). В результате новых взаимодействий между анионами и молекулами геля могут возникать разные реакции геля [89,118,140]. Наиболее распространенным является разрушение структуры геля (визуальный «гель-золь переход»), что может применяться при визуальном обнаружении ионных аналитов и в области доставки лекарств [141]. С другой стороны, взаимодействие с анионом может привести к переходу «гель-гель» [142], который происходит с изменением гель-сетки (рис.1.11).

Некоторые анионы, такие как CN^- и F^- , в отличие от Br^- , Cl^- и AsO_4^{3-} , ведут себя как хорошие нуклеофилы, основность и нуклеофильность которых сильно зависят от природы рабочего растворителя. Например, в полярном апротонном растворителе нуклеофильность увеличивается при движении вверх по таблице Менделеева в ряду галогенидов: $\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$; но в полярных протонных

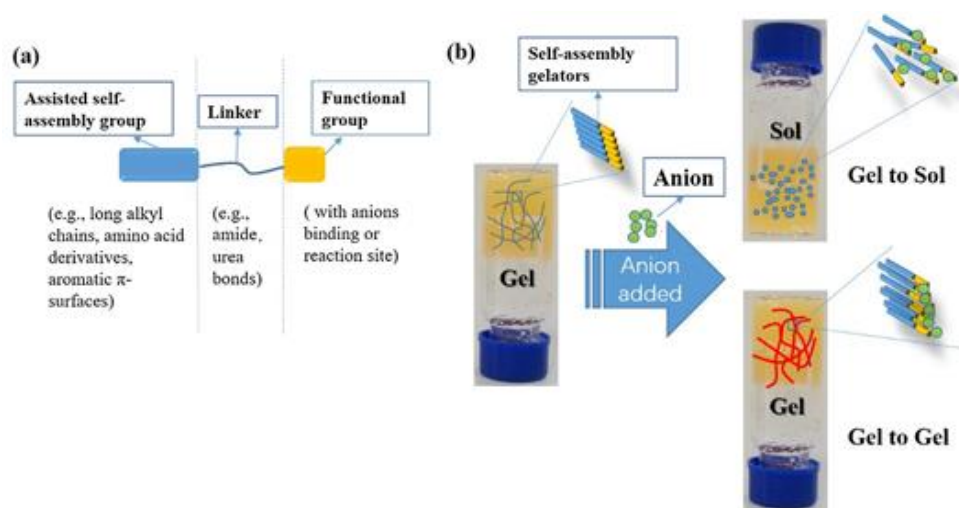


Рис. 1.11. Схематичное представление трех составных частей анионного инициатора (а); два разных пути превращения геля при добавлении аниона (б) [118]

растворителях нуклеофильность увеличивается в ряду галогенидов в обратном направлении: $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$ [118,143]. Таким образом, высокая нуклеофильность

анионов в некоторых специфических растворителях обеспечивает преимущество для необратимой реакции с молекулами органических гелеобразователей. Это делает такие инициаторы гелеобразования более выгодными по сравнению с другими с точки зрения их селективности. Химические изменения инициатора гелеобразования могут существенно изменить структуру и свойства самоорганизующейся гель-сетки, что часто вызывает переход геля в золь [118].

При проведении сравнительного анализа научных исследований последних десяти лет можно заметить следующую тенденцию: в гидрогелях (растворитель – вода) следующие анионные инициаторы гелеобразования приводят к переходу «гель-золь» - AsO^- , H_2PO_4^- , F^- , I^- , CN^- , а анионные инициаторы, приводящие к переходу «золь-гель» - Cl^- , алкилкарбоксилатные анионы. Однако, если в качестве растворителя использовать кроме воды еще ацетон или ДМСО (диметилсульфоксид), то в любом случае будет происходить «гель-золь переход». Такой же переход будет наблюдаться, если вместо воды использовать ДМСО или ДМФ (диметилформамид), 2-этилгексанол, CH_3CN (ацетонитрил), 1,2-дихлорбензол, ксилол, бензол, CHCl_3 (трихлорметан). Переход «гель-гель» отмечается в гидрогелях с ДМСО и иодид-анионом; в гелях с глицерином и CN^- анионом; гелях с ДМСО и CN^- анионом; а также гелях, в которых в качестве растворителя используется ДМФ, а в качестве аниона - CN^- , SCN^- , S^{2-} , I^- , F^- , HSO_4^- [118]. Другим примером перехода гель-золь, инициируемого F^- в результате процесса депротонирования амидных групп, является дискретный гексагональный металлоцикл 9 с тетрафенилэтиленовыми и амидными группами [118]. Введение фторида тетрабутиламмония (ТБАФ) в образец геля 9 вызывало очевидный переход из геля в золь. Интересно, что восстановление геля авторами исследования достигалось раствором HClO_4 (рис.1.12), который мог предоставить H^+ для восстановления водородных связей между амидами.

Как правило, перед добавлением внешних анионов взаимодействие водородных связей способствует образованию самоорганизующихся гелей. Однако, по мере добавления внешних анионов сильная межмолекулярная

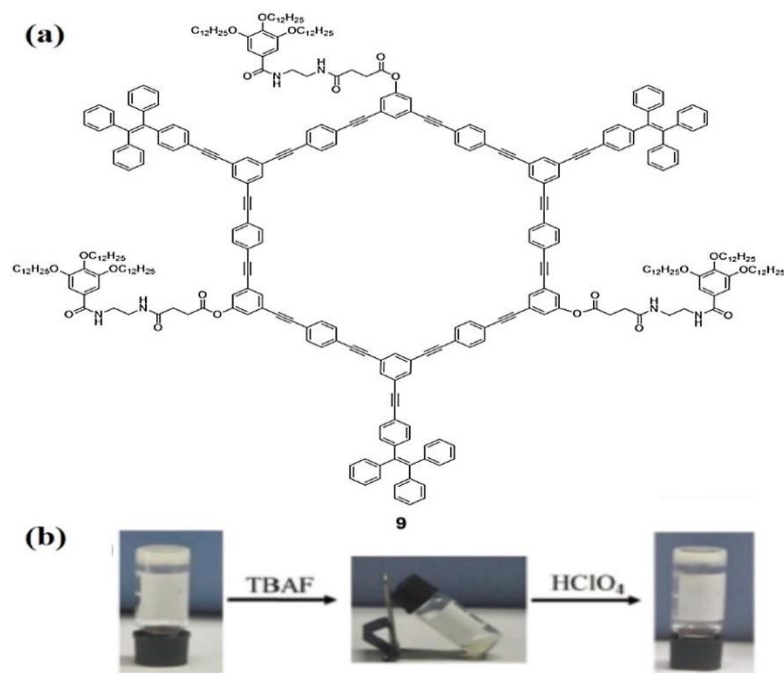


Рис.1.12. Схема строения соединения дискретного гексагонального металлоцикла (9) с тетрафенилэтиленовыми и амидными группами (а), гель-золь-гель переход при добавлении фторида тетрабутиламмония (ТБАФ) и раствора хлорной кислоты (HClO_4) [118]

водородная связь между вводимым анионом и донором Н-связи может мешать существующей структурной организации и приводить к изменению свойств гелей [144].

Стоит отметить, что это изменение (фазовый переход «гель-золь» или «гель-гель»), вызванное добавлением анионов, непредсказуемо из-за сложной природы самоорганизаций. В настоящей работе исследовано влияние Cl^- , F^- и SO_4^{2-} анионов на механизмы гелеобразования. Поскольку роль галогенидов и сульфатов как инициаторов структурообразования изучена недостаточно, полученные результаты (детальный анализ их воздействия на кинетику золь-гель перехода и морфологию гидрогелей, представленный в данной работе) вносят существенный вклад в понимание процессов самоорганизации подобных систем. Так, например, в работе проведено исследование процессов гелеобразования с достаточно большим количеством хлоридов металлов (натрия, калия, магния, марганца, никеля, кобальта, меди, железа, алюминия) с разными комплексообразующими свойствами. Но главным отличием является получение устойчивых композиций

гидрогеля с фторид-анионами, что до этого не было изучено, а наоборот в литературных источниках описаны исследования, где фторид-анионы приводят к разрушению геля-сетки и способствуют «гель-золь переходу».

1.4.3. Методы исследования супрамолекулярных систем

Супрамолекулярные соединения, способные к самоорганизации, активно изучаются последние десять лет. Этот интерес в основном обусловлен свойствами, проявляемыми супрамолекулярными системами: способностью к самоорганизации и саморганизации, тиксотропностью, способностью к созданию соединений определенной конструкции, обладающей задаваемыми свойствами и характеристикам, которые приобретают супрамолекулярные системы благодаря внесению тех или иных исходных компонентов в их структуру для дальнейшего применения в разных областях науки и т.д. При этом одно из важных свойств - быть носителями/матрицей для других веществ. Большинство таких соединений содержат в себе минимум два вещества, что и позволяет варьировать и наделять их определенными свойствами. Подобные соединения могут, например, сочетать в себе одновременно свойства гидрогелей и супрамолекулярных полимеров, что представляет большой интерес из-за формирования структуры из низкомолекулярных исходных соединений посредством нековалентных взаимодействий с возможностью удерживать растворитель в супрамолекулярной пространственной геле-сетке [131], но одновременно вызывает ряд трудностей в интерпретации образующихся сложных структурных агрегатов.

Основными методами исследования подобных систем являются: реологические, визуальные (микроскопические) и спектральные (качественный и количественный ИК-спектральный анализ, УФ-, ЯМР-, Раман-спектроскопия) методы анализа. Рассмотрим подробнее методы исследования, с помощью которых возможно исследование супрамолекулярных структур в настоящее время.

Прежде всего, наиболее часто используемые физико-химические методы исследования – спектроскопические. Так, например, процессы супрамолекулярной

самоорганизации невозможно исследовать без качественного анализа структуры на атомном и молекулярном уровне. Качественный ИК-спектральный анализ позволяет установить структуру и взаимодействие функциональных групп в ходе процессов самоорганизации. В паре с качественным ИК-спектральным анализом также используется Раман-спектроскопия, позволяющая исследовать процессы комплексообразования с участием, например, катионов металлов, что активно используется в современных исследованиях. Рентген-структурный анализ необходим для исследования кристаллической фазы, которая может образоваться в веществе. Измерение малоуглового рассеяния нейтронов и кристалличность можно исследовать с помощью дифрактометра. С помощью кругового дихроизма возможно исследовать такие характеристики как конформацию пространственной структуры, хиральность молекул. Данный метод используется в основном для изучения структуры органических молекул, обладающих оптической изомерией. Супрамолекулярные системы за счет сложной пространственной структуры обладают определенной вязкостью, причем их вязкостные свойства меняются при варьировании инициаторов гелеобразования. Исследования вязкости в супрамолекулярных системах основаны на изучении взаимодействий между исходными компонентами, в результате которых и происходит изменение вязкости. Чаще всего это нековалентные взаимодействия такие как водородные связи, различные варианты π -стекинга, комплексообразование, галогенные связи и т.д. Иногда в таких взаимодействиях могут присутствовать и донорно-акцепторные ковалентные связи, которые, несмотря на то, что являются менее сильными, являются важным фактором для изучения структуры и свойств комплексов.

Взаимодействие исходных компонентов в ходе процесса гелеобразования может приводить к изменению вязкости в результате «золь-гель перехода». В случае «золь-гель» или «гель-золь перехода» реологические измерения проводятся с помощью реометра или вискозиметра. Реологические измерения позволяют исследовать жесткость связи, способность к самовосстановлению, модуль упругости, амплитуду деформации и т.д. На молекулярном уровне «золь-гель» или «гель-золь» переход сопровождается изменением размера небольших агрегатов

или мицелярных частиц, участвующих в образовании кластеров. Для исследования подобных процессов используют метод динамического светорассеяния, позволяющего зафиксировать перестройки супрамолекулярного ансамбля на наноразмерном уровне.

Широкое применение в изучении процессов самоорганизации получили электрохимические методы исследования, такие как рН-метрия, измерение дзета-потенциала, кондуктометрия и т.д. Так, например, рН-метрия считается характеристикой определения концентрации ионов водорода в растворе. Непрерывный мониторинг динамики ионов водорода позволяет изучать процессы самоорганизации в реальном времени. Дзета-потенциал — это физическое свойство, присущее любой частице в суспензии, макромолекуле или поверхности материала. Его можно использовать для оптимизации составов суспензий, эмульсий и белковых растворов, прогнозирования взаимодействия с поверхностями и оптимизации образования пленок и покрытий. Определение дзета-потенциала может сократить время, необходимое для создания пробных составов. Его также можно использовать в качестве вспомогательного средства для прогнозирования долговременной стабильности [145]. Образование супрамолекулярных ансамблей из низкомолекулярных исходных веществ вызывает изменение заряда на поверхности образующихся частиц или мицелл. Таким образом, измерение дзета-потенциала напрямую позволяет изучать процессы самоорганизации подобных систем. В результате взаимодействия простых исходных веществ и образования сложных супрамолекулярных агрегатов происходит уменьшение концентрации растворенных ионов в растворе за счет их комплексообразования в сложные структуры. Именно процесс уменьшения концентрации свободнодвижущихся ионов в растворе и возможно определить с помощью метода кондуктометрии.

Используя визуальные методы исследования возможно изучать сложные супрамолекулярные системы с высоким разрешением. Просвечивающая электронная микроскопия, оснащенная специальной камерой, позволяет детально изучить морфологию образца, рост нановолокон, размер и характер гель-сетки. В

дополнение к этому методу сканирующая электронная микроскопия дает понимание о размерах структурных агломератов и пространственной картины поверхности, исследуемой супрамолекулярной системы в целом. Кроме того, характеризацию нановолокон позволяет провести атомно-силовой микроскоп, когда зонд взаимодействует с поверхностью образца с помощью тончайшей иглы - кантиливера. Часто наряду с выше перечисленными методами анализа используют метод динамического атомистического моделирования, проходящего в несколько этапов: создание кубических ячеек, моделирование молекулярной динамики, анализ полученных динамических трехмерных структур. Метод компьютерного моделирования часто применяют совместно с практически полученными данными для сравнения, подтверждения данных и, в итоге, получения общей картины механизмов, происходящих в ходе процесса самоорганизации супрамолекулярных систем.

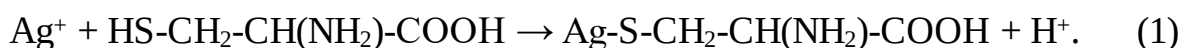
В последнее время все большую популярность приобретают методы, исследующие клеточное поведение супрамолекулярных систем, например, водных или полимерных гидрогелей. Это связано с растущей популярностью исследований в данной области. Исследуемые супрамолекулярные системы инкубируются на культивированных тест-штаммах (бактерий, микроорганизмах, живых клетках человека, клетках злокачественных опухолей и т.д.), и определяется активность или замедление роста тестовых культур. Таким образом исследуется биосовместимость супрамолекулярных систем/гидрогелей и их способность к, например, проявлению антибактериальных и антимикробных свойств.

1.5. Строение, свойства и возможные области применения цистеин-серебряных гидрогелей

Гидрогели – один из самых популярных объектов исследования в настоящее время. В основном благодаря набору свойств, которыми могут обладать получаемые гидрогели. Универсальный способ получения супрамолекулярных гидрогелей – это многокомпонентная самосборка. В результате возможно разрабатывать супрамолекулярные гидрогели различной молекулярной сложности,

улучшенными способами стыковки между нановолокнами, настраиваемыми механическими свойствами, созданием новых материалов для изучения *in situ* и разнообразной морфологией [24,146]. Эти свойства делают такие гидрогели подходящими для широкого спектра применений в доставке лекарств [1,14], тканевая инженерия [4,5], проектирование нанореакторов и оптоэлектронных материалов. В частности, многокомпонентные гели могут обладать преимуществами по сравнению с системами из отдельных компонентов, например, гели, проявляющие оптоэлектронные свойства [6]. Существуют также примеры, когда поведение клеток можно улучшить с помощью многокомпонентных гидрогелей [1]. Также возможно приготовить системы с необычным поведением, например, с замедленным гелеобразованием [49] или двухступенчатый реологический контроль [5].

Гидрогели на основе аминокислоты L-цистеина, нитрата серебра и солей металлов вследствие своей супрамолекулярной природы относятся к «умным» мягким гелям, которые способны менять свою структуру в ответ на внешние воздействия, что в конечном итоге определяет их различные свойства и области применения. Такие системы обладают рядом преимуществ. Помимо амфифильности молекул и участия нековалентных взаимодействий в гелеобразовании (как и в биологических структурах), они характеризуются доступностью, высокой чистотой, известной химической структурой, биосовместимостью исходных компонентов и легкостью гелеобразования [147,148]. Было обнаружено, что при смешивании водных растворов аминокислоты L-цистеина (L-цис) и нитрата серебра (AgNO_3) происходит быстрое формирование молекул меркаптида серебра (МС), при этом протон в тиольной группе аминокислоты замещается на атом Ag [148]:



Молекулы МС нековалентно взаимодействуют между собой, образуя супрамолекулярные цепочки $(\text{--Ag-S(R)--Ag-S(R)--})_n$, где R – фрагмент молекулы L-цистеина, и кластеры из этих цепей. При добавлении в ЦСР различных низкомолекулярных электролитов запускается процесс гелеобразования и

формируется супрамолекулярный гель [7,149]. Было установлено также, что гидрогели на основе ЦСР обладают тиксотропными свойствами: при механическом воздействии гидрогель разрушается и переходит в состояние раствора, но позже, в условиях покоя, из раствора снова восстанавливается гель [7,149,150]. В ходе изучения данных гелей было показано, что их нативное состояние, а также возможность модификации исходных компонентов, из которых строится пространственная сетка геля, определяют различные свойства: антибактериальные [7,150], противораковые, фоточувствительные, электрохимические, пленкообразующие [149]. Данные свойства хорошо коррелируют со структурой кластеров, из которых формируется гель-сетка, а также химической природой вводимого в систему низкомолекулярного аниона [7,149]. Однако, до сих пор не выяснено, какую роль играет валентность и химическая природа катиона электролита в процессе гелеобразования, его влияние на кинетику процесса, реологические и структурные характеристики получаемых гелей. Вместе с тем, многие из вводимых в ЦСР катионов металлов, сами по себе обладают биологической активностью, тем самым способны усиливать свойства формирующегося геля [148]. Исходя из этого, актуальность настоящей работы носит не только фундаментальный, но и прикладной характер. Не меньшую роль на характер образующейся гель-сетки оказывает также и анион вводимого электролита.

В связи с этим возможные области применения цистеин-серебряных гидрогелей связаны со свойствами, которые приобретают гидрогели в зависимости от их состава. Так, благодаря одному из исходных веществ - нитрату серебра – цистеин-серебряный раствор и гидрогель, получаемый на его основе, проявляют антибактериальные свойства. Благодаря второму исходному веществу – аминокислоте L-цистеину – цистеин-серебряные гидрогели обладают регенерирующими свойствами. Кроме того, в качестве электролитов используются микро- и макроэлементы: катионы биоактивных металлов и анионы, не оказывающие негативного влияния на организм человека. Кроме электролитов в гидрогель можно добавлять дополнительно активное или лекарственное вещество.

В результате гидрогели приобретают ряд свойств, благодаря которым возможно применять их в качестве матрицы для лекарственного вещества или в виде самостоятельного компонента широкого медицинского спектра действия. Так, например, в данной работе в гидрогель на основе ЦСР и сульфата меди добавляется метиленовый синий, обладающий антимикробными свойствами. Метиленовый синий (МС) относится к списку жизненно важных препаратов ВОЗ для лечения метгемоглобинемии (антидот при отравлении цианидами, угарным газом и сероводородом). В онкологии МС используется как фотосенсибилизатор, особенно активно работающий при воздействии света и способствующий разрушению патологических клеток. В последнее время все чаще разрабатываются фотогели на основе низкомолекулярных гелеобразователей (НМГ) [49,50]. Материалы, полученные на их основе, благодаря множественным нековалентным взаимодействиям между молекулами НМГ, сочетают в себе мягкость структуры, разнообразие формируемых наноструктурных элементов (определяющих функциональные свойства) и уникальные характеристики, проявляющиеся при их совместном действии. Известен ряд примеров получения гелей на основе НМГ для фотодинамической терапии [51,52]. Установлено, что некоторые НМГ способны захватывать молекулы метиленового синего (МС) и образовывать стабильные гели [53–57]. Однако сведения об использовании гелей на основе НМГ, содержащих МС, в фотодинамической терапии отсутствуют. В то же время аминокислоты и их производные способны образовывать разнообразные наноструктуры, которые могут найти применение в различных областях биомедицины [58]. В данной работе продемонстрировано, что супрамолекулярные гидрогели, полученные на основе L-цистеина и различных солей серебра, обладают уникальным комплексом свойств, включая противоопухолевую [59–62], антибактериальную и антибиопленочную [63], а также фоточувствительную [64] активность. Сочетание этих свойств, наряду с возможностью включения фотосенсибилизатора метиленового синего (МС) в матрицу геля, позволит добиться синергетического эффекта, что чрезвычайно важно для целей фотодинамической терапии (ФДТ).

А благодаря одному из важнейших свойств – тиксотропии – гидрогели

обладают динамичностью и обратимостью, способны самовосстанавливаться, а значит быть устойчивыми к механическому разрушению.

1.6. Глутатион, как производное аминокислоты L-цистеина: особенности, значение, свойства и возможные области применения

Трипептид γ -L-глутамил-L-цистеинилглицин, известный как глутатион (GSH) (рис. 1.13), является важнейшим низкомолекулярным антиоксидантом, синтезируемым в клетках. Его синтез происходит путем последовательного присоединения цистеина к глутамату с последующим присоединением глицина. Сульфгидрильная группа ($-SH$) цистеина участвует в реакциях восстановления и конъюгации, которые обычно считаются наиболее важными функциями GSH. Эти реакции обеспечивают удаление пероксидов и многих ксенобиотиков; однако GSH также участвует в регуляции клеточного цикла [151,152]. В организме глутатион может существовать в двух формах: восстановленной (GSH), когда тиольная группа находится в свободном виде, и окисленной (GSSH) (рис.1.13).

Глутатион (GSH) играет важную роль в нейтрализации многих реакционноспособных соединений. Однако, прежде чем рассматривать эти аспекты, необходимо понять происхождение данных соединений и те патологические последствия, которых помогает избежать глутатион.

Хиноны представляют собой класс молекул, способных к окислительно-восстановительному циклическому превращению (редокс-циклированию); к ним относятся некоторые лекарственные препараты и ксенобиотики. В данном контексте под редокс-циклированием понимается способность молекул переходить из окисленной формы в восстановленную и обратно, генерируя при этом активные формы кислорода, такие как супероксид-анион (O_2^-) и пероксид водорода (H_2O_2). В ходе этой реакции хинон восстанавливается в результате переноса одного электрона, образуя семихинон — свободный радикал, способный реагировать с кислородом с образованием супероксид-аниона (O_2^-).

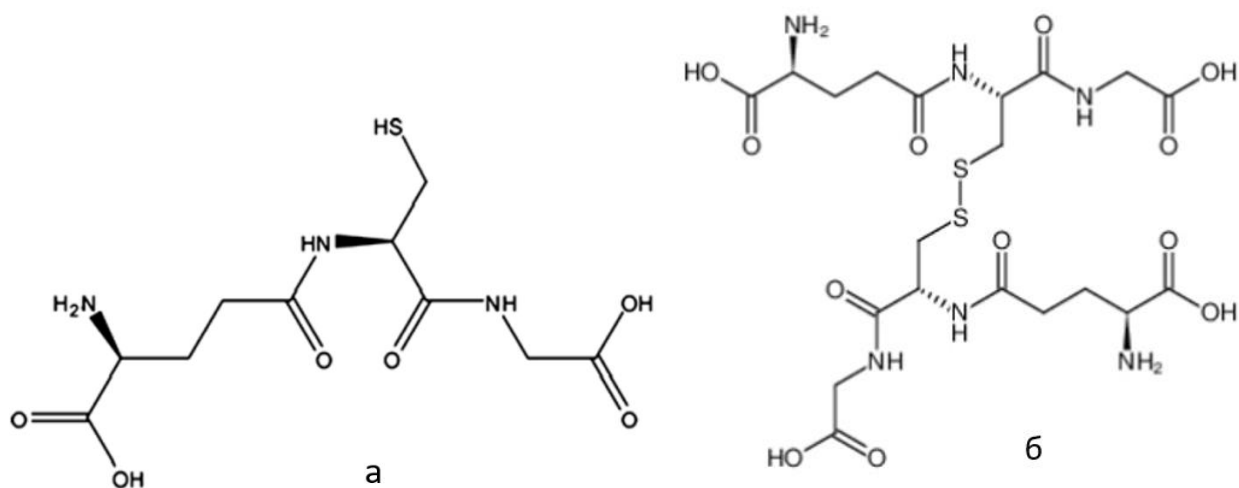


Рис. 1.13. Стереохимическая структура глутатиона: а – восстановленная форма, б – окисленная форма [151]

В клетках существуют и другие участки, где могут образовываться активные формы кислорода. У фагоцитов важная роль в механизме уничтожения микроорганизмов отводится продукции активных форм кислорода [151, 153]. Первым ферментом, участвующим в этом процессе, является НАДФН-оксидаза, генерирующая супероксид-анион (O_2^-). В настоящее время установлено, что этот фермент относится к классу ферментов, присутствующих практически во всех клетках [151, 154]. Образовавшийся супероксид-анион может превращаться в пероксид водорода (H_2O_2) в ходе дисмутации, протекающей как в виде относительно быстрой неферментативной реакции, так и в виде очень быстрой реакции, катализируемой одной из супероксиддисмутаз (СОД). Некоторые фагоциты способны секретировать ферменты — миелопероксидазы, — катализирующие реакцию между H_2O_2 и галогенидами (хлоридами или бромиды) с образованием хлорноватистой ($HOCl$) или бромноватистой ($HOBr$) кислоты [151, 155]. Эти кислоты (гипогалогенистые кислоты) уничтожают бактерии, однако могут также повреждать нормальные ткани, тем самым способствуя развитию воспалительной реакции.

Образующийся H_2O_2 может представлять опасность при наличии в клетках металлов в восстановленной форме. H_2O_2 способен реагировать с ионами железа(II) (Fe^{2+}), образуя гидроксильный радикал ($\bullet OH$). Этот радикал обладает способностью окислять тефлон (фторопласт) и любые органические молекулы со скоростью,

близкой к диффузионному пределу. Супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$) способен восстанавливать железо(III) (Fe^{3+}) до Fe^{2+} , что указывает на его двойную роль в процессе образования $\cdot OH$; впрочем, восстановление Fe^{3+} может происходить и под действием других восстановителей, таких как аскорбиновая кислота (витамин С). Одной из опасностей, связанных с образованием $\cdot OH$, является его возникновение вблизи клеточных мембран. Под действием $\cdot OH$ липиды могут окисляться, запуская цепную реакцию свободнорадикального окисления, которая приводит к повреждению мембраны. Помимо повреждения мембран, опасность перекисного окисления липидов заключается в образовании таких побочных продуктов, как 4-гидрокси-2-нонenal (HNE). Арахидоновая кислота — это полиненасыщенная жирная кислота, входящая в состав мембран всех клеток. При окислении это вещество может расщепляться с образованием широкого спектра соединений, включая α,β -ненасыщенные альдегиды [151, 156]. Эти соединения токсичны, так как способны вступать в реакции с клеточными белками — в частности, с остатками цистеина, лизина или гистидина — посредством присоединения по Михаэлю к двойной углерод-углеродной связи или путем образования оснований Шиффа по двойной углерод-кислородной связи [157, 158, 159]. Подобные реакции могут приводить к инактивации белков. Например, взаимодействие с остатком цистеина в активном центре способно полностью лишить фермент его активности.

Существуют несколько защитных функций глутатиона:

1. Восстановление.

Глутатион (GSH) содержится в цитозоле клеток в концентрации 1–10 мМ [160]. В большинстве клеток концентрация GSH составляет около 1–2 мМ, тогда как в гепатоцитах, экспортирующих GSH, она может достигать примерно 10 мМ. В плазме крови уровень GSH находится в микромолярном диапазоне; однако в некоторых внеклеточных пространствах — например, в жидкости, выстилающей легкие (тонком слое жидкости, покрывающем воздушные пространства, где происходит газообмен), — наблюдается высокая концентрация GSH, секретлируемого эпителиальными клетками [151, 161, 154]. У людей, которые курят или вдыхают частицы и другие окислители, может возникать воспаление,

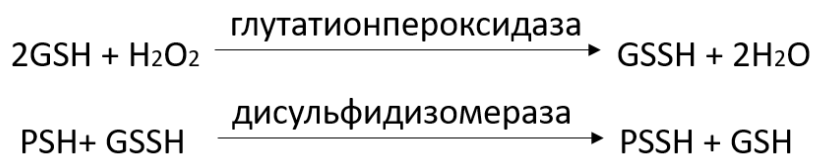
сопровожающееся проникновением нейтрофилов из крови через эндотелиальные и эпителиальные клетки в воздушные пространства. Протискиваясь между клетками, нейтрофилы высвобождают HOCl , который может вступать в реакцию с GSH, секретируемым эпителиальными клетками и в норме защищающим их [163]. У пациентов с муковисцидозом, у которых секреция глутатиона (GSH) в жидкость, выстилающую альвеолы, снижена по сравнению с нормой, а также у курильщиков, чьи легкие подвергаются воздействию множества окислителей (включая диоксид азота и H_2O_2), наблюдаются как хроническое воспаление, так и пониженный уровень GSH [151, 164]. Хотя многие исследования роли GSH при воспалении касались легких, подобные реакции могут происходить в любом органе.

Имеются данные о том, что при других заболеваниях легких, например, при идиопатическом легочном фиброзе, также наблюдается сниженная концентрация GSH [165]. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить, какой вклад дефицит GSH вносит в развитие патологий, т.к. понимание механизмов транспорта GSH через плазматическую мембрану имеет важное значение для лечения заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом.

Процессы, происходящие внутри клеток, существенно отличаются от тех, что протекают во внеклеточной среде. Глутатион играет важную роль в различных клеточных процессах. В митохондриях он играет ключевую роль в регуляции выбора между апоптозом и некрозом. В ядре GSH выступает ключевым регулятором клеточного деления [151]. Хотя снижение уровня внутриклеточного и внеклеточного GSH, безусловно, оказывает негативное влияние на легкие, большинство исследований патологий, связанных с транспортом и метаболизмом GSH, было проведено на примере печени. В основном в литературных источниках представлены обзоры, посвященные роли изменений уровня внутриклеточного GSH при заболеваниях легких [166], печени [167] и вирусных инфекциях [168].

В процессах антиоксидантной защиты клеток основная часть глутатиона (GSH) используется тремя представителями семейства глутатионпероксидаз (GPx) и одной из пероксиредоксинов (Prdx 6). Эти ферменты катализируют восстановление H_2O_2 с участием глутатиона в восстановленной форме (GSH) до

H₂O и глутатиона в окисленной форме (GSSG).



, где GSH – восстановленная форма глутатиона, GSSH – окисленная через тиольную группу форма глутатиона, PSH – белковый тиолят (белок, имеющий тиольную группу), PSSH – белковый дисульфид.

Рис. 1.14. Переход глутатиона из восстановленной в окисленную и обратно в восстановленную форму [151]

GSSG потенциально токсичен для клеток, однако, в норме клетки обладают высокой активностью глутатионредуктазы, поддерживающей большую часть глутатиона в восстановленной форме (GSH). Часть GSSG также выводится из клеток. В условиях окислительного стресса GSSG может вступать в реакцию дисульфидного обмена с тиольной группой белка, образуя смешанный дисульфид белка (PSSG); последний, в свою очередь, может вступать в дальнейший обмен с другой тиольной группой белка, приводя к образованию белкового дисульфида [169] (рис.1.14). Эти реакции протекают довольно медленно, если не катализируются ферментами, такими как белковая дисульфидизомераза (PDI) — важный фермент, содержащийся в высоких концентрациях в эндоплазматическом ретикулуме, где происходит фолдинг белков. Фактически, просветы (цистерны) эндоплазматического ретикулума — это единственная часть клетки, характеризующаяся относительно высоким соотношением GSSG/GSH. В цитозоле образование PSSG носит кратковременный характер, за исключением случаев окислительного стресса [170].

Образование PSSG (смешанных дисульфидов белка и глутатиона) при участии определенных ферментов может играть роль в передаче сигналов, хотя точный механизм их формирования PSSG в ходе нормального клеточного метаболизма остается неясным. Хотя реакция белкового дисульфидного обмена с участием тиола может катализироваться ферментом PDI, некоторые белки обладают таким микроокружением, которое способствует образованию тиолат-

аниона ($-S^-$); последний значительно более реакционноспособен, чем тиол, как в реакциях с H_2O_2 , так и в процессах дисульфидного обмена. Для этого необходимо, чтобы в непосредственной близости от остатка цистеина находились основные аминокислотные остатки, облегчающие диссоциацию тиольной группы (значение pK_a которой в норме составляет около 8,3). Глутатионпероксидаза катализирует образование GSSG, который потенциально может вступать в реакцию обмена с тиолом с образованием смешанного дисульфида. Однако в цитозоле даже при окислительном стрессе соотношение GSH/GSSG остается очень высоким, что делает такую реакцию обмена термодинамически невыгодной. Фермент PDI способен ускорять эту реакцию, но, как и любой катализатор, не может сместить равновесие [170]. В качестве альтернативы было высказано предположение, что при физиологической передаче сигналов, когда H_2O_2 выступает в роли вторичного мессенджера, некоторые белковые тиолаты могут вступать в реакцию с образованием сульфеновой кислоты (PSOH); однако для большинства тиолатов (включая тиолат глутатиона) скорость этой неферментативной реакции слишком мала, чтобы объяснить наблюдаемую инактивацию ферментов [151, 171]. При этом известно, что такая реакция может протекать в активном центре пероксиредоксинов, где взаимодействие H_2O_2 с тиолом происходит на несколько порядков (до шести) быстрее, чем с тиолатной формой глутатиона. В любом случае, образовавшийся белковый сульфенат быстро реагирует с GSH, давая смешанный дисульфид; именно этот механизм может лежать в основе образования PSSG для ряда белков в цитозоле при окислительном стрессе, когда концентрация H_2O_2 становится достаточной для преодоления ограничений, связанных с низкой константой скорости реакции.

Выведение многих ксенобиотиков может осуществляться путем конъюгации с глутатионом (GSH) с последующим выносом образовавшегося продукта из клетки [172]. Продукт присоединения GSH также может претерпевать перегруппировку с образованием хинола, который обычно считается менее токсичным соединением по сравнению с хиноном.

GSH также участвует в выведении электрофилов, таких как HNE. Почти все

эти реакции катализируются ферментами GST; в частности, в клетках человека присутствует специфическая изоформа, обеспечивающая конъюгацию GSH с HNE со скоростью, примерно в 100 раз превышающей скорость неферментативной реакции. Это основной путь выведения HNE и других электрофилов, способных к конъюгации с GSH.

Хотя глутатион (GSH) является важнейшим низкомолекулярным антиоксидантом, синтезируемым в клетках, существуют и другие низкомолекулярные антиоксиданты, поступающие с пищей, — например, витамины E (α -токоферол) и C (аскорбиновая кислота). Витамин E способен восстанавливать гидроксильные радикалы липидов и пероксиды липидов, образующиеся из полиненасыщенных жирных кислот. Окисленный витамин E затем восстанавливается витамином C в ходе быстрой неферментативной реакции. Окисленный витамин C, в свою очередь, может быть переведен обратно в восстановленную форму посредством ферментативных реакций, в одной из которых GSH используется в качестве субстрата [170].

Синтез самого же глутатиона проходит в несколько этапов:

- Первый этап синтеза GSH **de novo** заключается в соединении цистеина с глутаматом с образованием γ -глутамилцистеина. Эта реакция катализируется ферментом глутамат-цистеинлигазой (GCL), который также называют γ -глутамилцистеинсинтетазой (рис. 1.15). Для образования амидной связи между γ -карбоксильной группой глутамата и аминогруппой цистеина этому ферменту требуется сопряженный гидролиз АТФ [173].
- На следующем этапе задействован фермент глутатионсинтетаза, отвечающий за присоединение глицина к дипептиду с образованием GSH (γ -глутамилцистеинил-глицина); этот процесс проходит при гидролизе АТФ [151, 174]. GSH может транспортироваться из клеток. Этот механизм имеет физиологическое значение, поскольку гепатоциты обеспечивают поступление GSH в плазму, где он служит источником цистеина для синтеза GSH в других клетках [175]. В

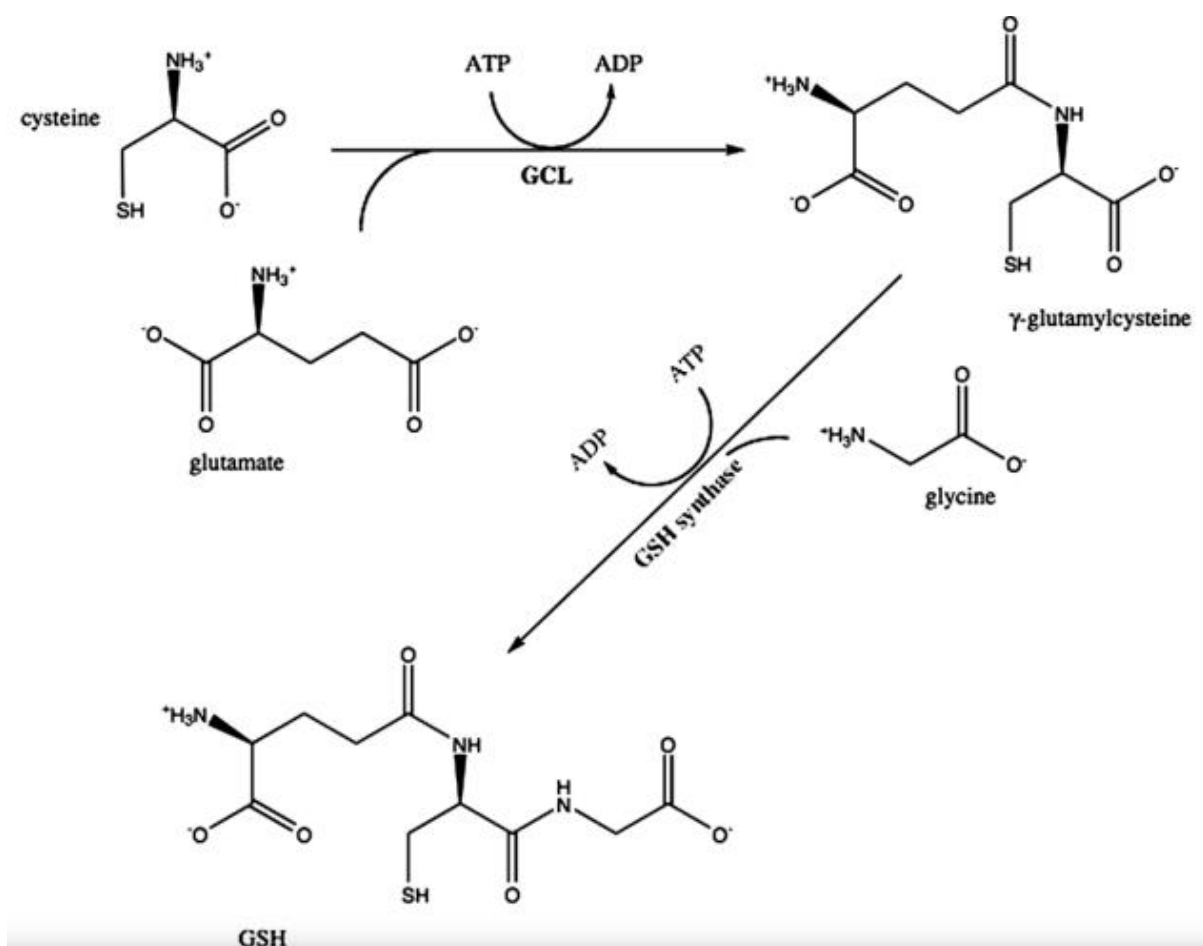


Рис.1.15. Схематичное представление этапов синтеза глутатиона в организме человека [151]

действительности концентрация GSH в плазме поддерживается на очень низком уровне из-за его метаболизма во многих других клетках [176]. Этот процесс требует участия двух ферментов, обычно локализованных на поверхности клеток. Фермент γ-глутамилтранспептидаза переносит остаток глутамата на другие аминокислоты, высвобождая цистеинил-глицин, который, в свою очередь, может расщепляться дипептидазой с образованием цистеина и глицина [151, 176]. Цистеин и глицин, а также γ-глутамиламинокислоты поступают в клетки с помощью специфических аминокислотных транспортеров и используются для биосинтеза GSH [177].

Как видно из литературных источников, глутатион играет важную роль в организме человека, а уменьшение его концентрации оказывает негативное влияние (повышение оксидативного стресса, образование сложных дисульфидных мостиков в гемоглобине и т.д.). В связи с этим актуальным является исследование в терапевтическом применении глутатиона. Поскольку повышение уровня GSH,

по-видимому, является универсальной реакцией на воздействие окислителей и электрофилов, а течение некоторых заболеваний усугубляется при снижении уровня GSH, были предложены методы повышения его концентрации. К таким методам относятся доставка в клетки проницаемых эфиров глутатиона [178] и повышение доступности цистеина с помощью нетоксичного предшественника — N-ацетилцистеина [179]. Терапевтически целесообразным представляется и повышение уровня GSH путем стимуляции его синтеза; в качестве средств для этого рассматривались такие природные соединения, как куркумин (основной компонент порошка карри; [180] и сульфорафан (мощный индуктор генов ферментов II фазы, содержащийся в брокколи; [181], однако ни одно из этих природных веществ не стало широко применяемым терапевтическим препаратом. С другой стороны, в медицинской практике применяются соединения, снижающие уровень GSH и тем самым повышающие чувствительность опухолей к химиотерапии или лучевой терапии. Некоторые ферменты могут быть высокоспецифично ингибированы бутионинсульфоксимином, что делает это вещество полезным инструментом как для изучения метаболизма GSH, так и для целей противоопухолевой химиотерапии [151, 182, 183, 184]. Ацивизин (AT-125) — ингибитор гамма-глутамилтранспептидазы (GGT) [185] — испытывался в качестве химиотерапевтического средства еще до того, как была установлена его способность ингибировать GGT; однако ацивизин также подавляет ферменты биосинтеза пуринов и пиримидинов, что, возможно, и является истинным механизмом его действия [186, 187]. Таким образом, предстоит еще многое сделать для понимания того, как можно воздействовать на синтез и метаболизм GSH в терапевтических целях.

Исходя из выше сказанного, очевидно, что глутатион играет важную роль в метаболических процессах, происходящих в организме человека. В данной работе исследования посвящены созданию устойчивых систем при смешении нитрата серебра и глутатиона, и возможности их использования в качестве противоопухолевых композиций.

1.7. Метиленовый синий: особенности, значение, свойства и возможные области применения

Метиленовый синий ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) — это тиазиновый органический краситель и сильный окислитель, обладающий способностью к обратимому восстановлению в бесцветную форму, хорошо растворим в воде и способен связываться с нуклеиновыми кислотами и белками клеток. Благодаря этому свойству имеет потенциал применения в медицинской области в качестве «маркера». Метиленовый синий способен образовывать прочные труднорастворимые комплексы с белками и нуклеиновыми кислотами (РНК и ДНК) микроорганизмов, что также обуславливает его антисептический эффект. Широкое применение метиленовый синий получил и благодаря фотодинамическим свойствам. Так в настоящее время проводятся исследования с использованием фотодинамической терапии для лечения различных видов рака и кожных заболеваний путем индукции апоптоза, некроза, активации иммунной системы или повреждения сосудов с использованием метиленового синего на мышинной модели плоскоклеточного рака и нормальной коже [188]. Кроме того, иногда плоскоклеточная карцинома сопровождается инфекцией. Традиционное лечение антибиотиками не всегда достаточно для устранения подобной инфекции, поэтому применение фотодинамической терапии с метиленовым синим интересным и эффективным решением, т.к. обладает широким спектром антибактериальной активности и неселективным воздействием, что затрудняет развитие антибиотикорезистентности [189].

В данной работе возможность применения метиленового синего в составе ЦСР рассматривается именно на клетках карциномы плоскоклеточного рака шейки матки человека — SiHa и спонтанно трансформированную анеуплоидную бессмертную клеточную линию кератиноцитов из клеток кожи взрослого человека — HaCaT, что является актуальным исследованием в настоящее время.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

2.1. Объекты исследования

Для приготовления цистеин-серебряного раствора в работе использованы следующие реактивы: аминокислота L-цистеин 99% фирмы «Acros», нитрат серебра 99 % фирмы «Lancaster». В качестве электролитов и инициаторов гелеобразования использованы соли металлов:

- **хлориды:** NaCl (хч), KCl (хч), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (хч), $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (чда), $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (чда) («Реахим»), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ч) («Химмедсервис»), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ч) («Дезмедхим»), ZnCl_2 (чда), $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (чда) («Ленреактив»);
- **сульфаты:** Na_2SO_4 (хч), K_2SO_4 (хч), $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ч), $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (хч), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ч) («Реахим»), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (чда) («Agate-Med»), $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (осч) («Химмедсервис»), $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (чда) («Ленреактив»), $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ (ч) («Вектон»);
- **нитраты:** NaNO_3 (чда), $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (чда) («Химмедсервис»), $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (ч) («Невареактив»);
- **фторид:** NaF (ч) («Вектон»); **бромид:** NaBr (хч) («Реахим»); **йодид:** NaI (хч) («Реахим»).

Кроме того, в качестве аналога L-цистеина использовали трипептид глутатион в восстановленной форме (γ -L-глутамил-L-цистеинглицин)% фирмы «AppliChem». А также для получения сложносоставного гидрогеля, состоящего из нескольких компонентов, использовали метиленовый синий в виде кристаллогидрата $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ч) фирмы «Agate-Med». Все перечисленные реактивы находились в кристаллическом виде, из которых в дальнейшем приготавливали растворы с концентрацией 1мМ. Для изучения метиленового синего (МС) готовили несколько концентраций и вносили каждую из них поэтапно в ЦСР: сначала МС, спустя 5 минут в эту же емкость вносили CuSO_4 (1 мМ), в результате чего образовывался вязкий гидрогель, удерживающий внутри себя МС. То же самое проводили с другими концентрациями МС.

На основе перечисленных реактивов были получены основные растворы для

дальнейшего изучения процессов самоорганизации в ЦСР и гидрогелях на его основе:

- Цистеин-серебряный раствор ($C_{Cys}=1,00$ мМ, $C_{AgNO_3}=1,25$ мМ и $C_{Cys}=3,00$ мМ, $C_{AgNO_3}=3,75$ мМ).
- Растворы солей ($C=1$ мМ).
- Раствор глутатиона ($C=1$ мМ).
- Раствор метиленового синего (концентрация от 1мкМ до 1,3 мМ).

2.1.1. Методика приготовления исследуемых образцов

Методика приготовления цистеин-серебряного раствора состоит из двух этапов: на первой стадии смешиваются водные растворы L-цистеина и нитрата серебра в соотношении 1/1.25 – Cys/AgNO₃. Данное соотношение выбрано как оптимальное из диапазона 1/1,25 – 1/1,27, т.к. по результатам, полученным физико-химическими методами, существенной разницы в данном интервале не установлено. Раствор становится мутным, опалесцирующим, бело-голубого цвета. На второй стадии: его помещают в темное место на 3-8 часов при комнатной температуре. После чего раствор становится прозрачным и приобретает светло-желтую окраску. Это означает, что стадия «созревания» цистеин-серебряного раствора закончилась [7,190]. Только после этого можно вносить в ЦСР электролиты для инициирования процесса гелеобразования в растворе. В качестве электролитов использовали соли металлов (хлориды, сульфаты, нитраты, фторид, бромид, иодид) [148,191-193]. Процесс гелеобразования для хлоридов и сульфатов занимал 5-10 мин., в то время как для фторида образование гидрогеля наблюдалось только на следующий день. С нитратами, бромидом и иодидом гидрогель не образовывался. Однако, эти исследования были необходимы для изучения влияния и механизма встраивания катиона металла в структуру ЦСР. Исследования проводились на двух системах концентраций ЦСР: 3мМ и 1мМ. Концентрация электролитов составляла 1мМ.

Для образования гидрогелей в ЦСР электролиты вносили в диапазоне от 0,05 мл до 0,75 мл на 1 мл ЦСР. В результате образовывался гидрогель с разной вязкостью. Затем проводили визуальную оценку полученных гидрогелей. Визуальная оценка прочности полученных гидрогелей проводили на основе пятибалльной шкалы по таблице прочности [7] от 0 до 5 баллов, где 0 – нет геля, 5 – прочный вязкий гель, который при переворачивании не деформируется (табл.1) [148, 191-193].

Таблица 1.

Пятибалльная шкала оценки прочности гидрогелей

Оценка (балл)	Визуальное описание характеристики полученного геля
0	Нет геля
1	Гель очень слабый
2	Гель непрочный, легко срывается вниз
3	Гель медленно стекает (ползет) по стенкам
4	Гель образует куполообразный мениск, но не стекает
5	Гель прочный, при переворачивании не деформируется

Для изучения механизма самоорганизации в качестве аналога аминокислоты L-цистеина использовали раствор глутатиона в концентрации 1мМ [194]. Методика приготовления глутатион-серебряного раствора проста и протекает в одну стадию, в отличие от ЦСР: смешивали глутатион ($C=1\text{мМ}$) и нитрат серебра ($C=1\text{мМ}$) в определенном соотношении. Для исследования готовили несколько соотношений раствора глутатиона (GSH) к нитрату серебра, представленных в табл.2:

Таблица 2.

Схема приготовления смеси глутатиона и нитрата серебра в разных соотношениях

Раствор	Соотношение исходных объемов, мл								
GSH	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
AgNO ₃	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	2,25

Для изучения возможного применения ЦСР в качестве матрицы-переносчика активного вещества использовали метиленовый синий. Методика приготовления данной смеси проходила в три этапа:

- на первой стадии приготавливали ЦСР с концентрацией 1 мМ, созревание которого также проходило в две стадии;
- затем на второй стадии в готовый ЦСР вносили определенную концентрацию метиленового синего. Смесь интенсивно перемешивали в течение 1 минуты;
- на третьей стадии в полученную смесь ЦСР и метиленового синего вносили в качестве инициатора гелеобразования 0,065 мл CuSO_4 , концентрация которого составляла 1 мМ. Смесь снова перемешивали в течение 1 минуты. После оставляли в покое на 10 мин.

В результате образовывался гидрогель, удерживающий в своей структуре активное вещество – метиленовый синий.

Для исследования свойств метиленовый синий готовили в нескольких концентрациях, представленных в табл.3.

Таблица 3.

Схема приготовления метиленового синего в разных концентрациях

№	Концентрация, М	№	Концентрация, М	№	Концентрация, М
1	$1,00 \cdot 10^{-6}$	8	$2,44 \cdot 10^{-5}$	15	$4,76 \cdot 10^{-4}$
2	$2,44 \cdot 10^{-6}$	9	$4,76 \cdot 10^{-5}$	16	$6,98 \cdot 10^{-4}$
3	$4,76 \cdot 10^{-6}$	10	$6,98 \cdot 10^{-5}$	17	$1,00 \cdot 10^{-3}$
4	$6,98 \cdot 10^{-6}$	11	$1,00 \cdot 10^{-4}$	18	$1,10 \cdot 10^{-3}$
5	$1,00 \cdot 10^{-5}$	12	$1,10 \cdot 10^{-4}$	19	$1,30 \cdot 10^{-3}$
6	$1,10 \cdot 10^{-5}$	13	$1,30 \cdot 10^{-4}$		
7	$1,30 \cdot 10^{-5}$	14	$2,44 \cdot 10^{-4}$		

По мере увеличения концентрации, интенсивность окрашивания получаемого гидрогеля возрастала. Для проведения дальнейших исследований были выбраны оптимальные концентрации метиленового синего: образцы № 1, 5, 11 и 17.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Исследование вязкости цистеин-серебряных гидрогелей методом вибрационной вискозиметрии

Изменение вязкости цистеин-серебряного раствора и гидрогелей на его основе определяли с помощью вибровискозиметра SV-10 (фирмы AND Company, Япония). Работа данного вискозиметра основана на камертонной вибрации лепестков, помещенных в кювету с раствором (рис.2.1).

В виду небольшой теплоемкости прибора для фиксирования значений вязкости время, которое требуется для достижения температурного равновесия невелико, следовательно, вязкость образца может быть измерена с высокой точностью. Основные характеристики вибровискозиметра следующие:

- непрерывные измерения в широком диапазоне в течение длительного времени (низкочастотные сенсорные пластины, имеющие амплитуду колебаний менее 1 мм, производят очень маленькую нагрузку на образец);
- измерение температуры образца в ходе работы вискозиметра;
- измерение текучего образца (две сенсорные пластины колеблются в противоположных направлениях. Поэтому ошибки исключены, даже если образец движется).



Рис.2.1. Вибрационный вискозиметр SV-10

Вязкость образцов измеряли в полистирольной кювете на 10 мл, вибрация сенсорных пластин осуществлялась с частотой 30 Гц с постоянной амплитудой около 1 мм. В результате работы вискозиметра на дисплее отображается произведение динамической вязкости и плотности образца (в единицах измерения $\text{мПа}\cdot\text{с}\cdot\text{г}/\text{см}^3$). Для получения динамической вязкости η следует поделить значение

вязкости с дисплея на расчетное значение плотности образца, а т.к. плотность исследуемых образцов изменяется в процессе гелеобразования, то определение значения динамической вязкости в мПа·с для гидрогелей не представляется возможным. Поэтому были введены «относительные единицы» вязкости, которые обозначают изменение вязкости в процессе гелеобразования, определяемое вискозиметром, и принимают значения мПа·с·г/см³. Измерение вязкости растворов и гелей осуществляли при комнатной температуре [148].

2.2.2. Исследование процесса самоорганизации в цистеин-серебряном растворе и гидрогелях на его основе методом УФ-спектроскопии

Из спектральных методов изучения вещества наиболее доступна видимая и ультрафиолетовая спектроскопия. Большим достоинством этого вида спектроскопии является высокая чувствительность и точность. Поглощение в видимой и ультрафиолетовой областях обуславливается изменением в электронном состоянии молекулы (электронные спектры) [195]. В нашем случае исследования проводились только в ультрафиолетовом диапазоне длин волн (190 – 400 нм). В большинстве случаев, при УФ облучении вещества не разрушаются и не меняют свои физические свойства, а происходит переход электронов с основного



а



б

Рис. 2.2. а) УФ спектрометр «Evolution Array», б) термостат с универсальной 8-поточной термостатируемой приставкой с элементом Пельтье

электронного уровня на возбужденный, что позволяет получать достоверные данные о химическом составе и структуре вещества.

В данной работе исследуемые образцы (ЦСР, гидрогели, система GSH/AgNO₃ и смеси с метиленовым синим) изучали на УФ спектрометре «Evolution Array» (фирмы «ThermoScientific»). Исследования проводили в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 мм (рис.2.2 а).

Кинетические исследования процесса «созревания» ЦСР при разной температуре проводили также на УФ спектрометре с дополнительно подключенным к нему термостатом с универсальной 8-поточной термостатируемой приставкой с элементом Пельтье (рис.2.2 б).

Полученные данные обрабатывали на программном обеспечении «VISIONCollect».

2.2.3. Изучение химического строения получаемых систем методом ИК-спектроскопии

Наиболее точным методом для определения структуры веществ, образующейся в ходе процесса самоорганизации, является ИК спектроскопия. Этот метод основан на определении химических групп (таких как -ОН, -COOH, -NH₂, C=O, C=C и т.д.), крупных радикалов и т.д. в результате совершения колебания атомов под действием инфракрасного излучения. Инфракрасную спектроскопию широко применяют для анализа смесей и идентификация чистых веществ. Количественный анализ основан на законе Бугера-Ламберта-Бера, то есть на зависимости интенсивности полос поглощения от концентрации вещества в пробе. При этом о количестве вещества судят не по отдельным полосам поглощения, а по спектральным кривым в целом в широком диапазоне длин волн. Качественный спектральный анализ позволяет идентифицировать пространственные и конформационные изомеры, изучать внутри- и межмолекулярные взаимодействия, характер химических связей, распределение зарядов в молекулах, фазовые превращения, кинетику химических реакций, регистрировать короткоживущие

(время жизни до 10^{-6} с) частицы, уточнять отдельные геометрические параметры, получать данные для вычисления термодинамических функций и др. Необходимый этап таких исследований - интерпретация спектров, то есть установление формы

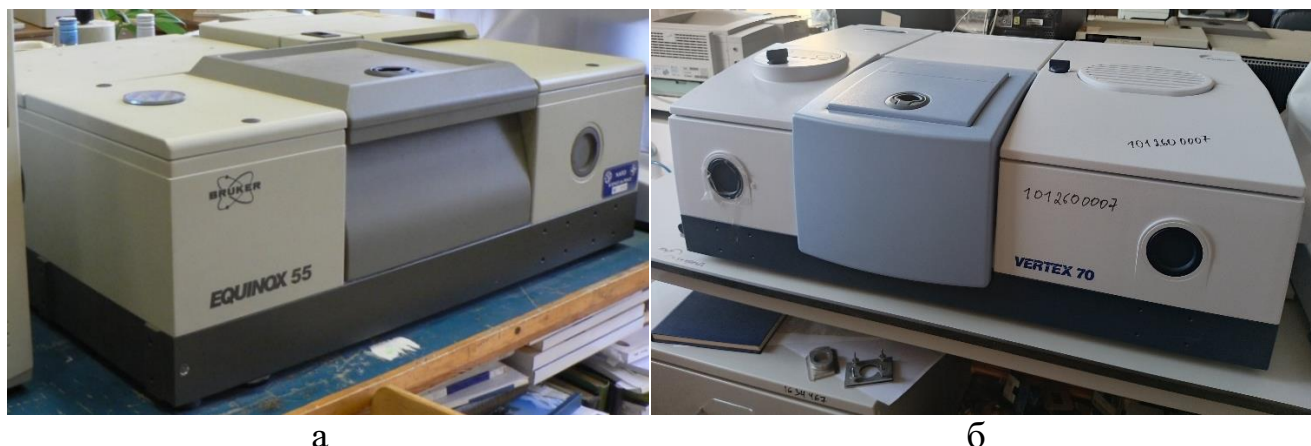


Рис.2.3. а) ИК-Фурье спектрометр Equinox 55, б) ИК-Фурье спектрометр Vertex-70

нормальных колебаний, распределения колебательной энергии по степеням свободы, выделение значимых параметров, определяющих положение полос в спектрах и их интенсивности. В ходе процесса самоорганизации в ЦСР и гидрогелях на его основе происходит смещение полос пропускания в ИК спектре по сравнению со спектрами исходных веществ. Таким образом, можно исследовать процессы комплексообразования (встраивание катионов в структуру гидрогеля). В данной работе использовали ИК-Фурье спектрометр «Equinox 55» (фирмы Bruker) и ИК-Фурье спектрометр «Vertex-70» (фирмы Bruker) (рис.2.3 а, б).

Чтобы снять ИК спектры ЦСР и гидрогелей обязательно необходимо перевести их в твердое состояние. Для этого их подвергают замораживанию. Существует два метода заморозки: 1 – помещение исследуемого образца в жидкий азот (моментальное замораживание при температуре -196°C), 2 – постепенное замораживание в морозильной камере при температуре -15°C . Нами был выбран второй метод заморозки. Пробоподготовка образцов состоит из нескольких этапов:

- исследуемый гидрогель осаждается при помощи заморозки в морозильной камере и последующего размораживания при комнатной температуре.
- осадок декантируется и высушивается при температуре 40°C .

- навеска высушенного гидрогеля ($m=2,5$ мг) перетирается в ступке с навеской КВг ($m=0,7$ г), прессуется в пресс-форме с помощью вакуумного пресса в полупрозрачную таблетку, которая затем помещается в ИК спектрометр.

Запись спектров осуществляли при помощи программы OPUS.

2.2.4. Определение размера и дзета-потенциала рассеивающих частиц ЦСР методом динамического светорассеяния

Метод динамического светорассеяния (ДСР или ДРС) является физическим методом анализа, позволяющим определять размеры частиц (от нано- до микронного размера), полимеров и макромолекул в растворах в жидком или вязкотекучем состоянии, в суспензиях и эмульсиях. Данный метод основан на регистрации сигнала, проходящего через раствор и улавливаемого специальными датчиками. Данный сигнал регистрирует изменение интенсивности рассеянного в результате броуновского движения частиц.

В работе использовали лазерный анализатор характеристик частиц субмикронного и нано диапазона, предназначенный для определения размеров частиц, дзета-потенциала, электрофоретической подвижности и молекулярной

массы частиц и молекул в жидких средах Zetasizer Nano ZS фирмы Malvern (рис.2.4).



Рис.2.4. Лазерный анализатор Zetasizer Nano ZS фирмы Malvern

Данный прибор получил широкое применение в многих областях: производственной, научной и исследовательской деятельности – везде, где необходим контроль характеристик частиц

субмикронного и нано диапазона: производство строительных материалов; производство химических веществ, пигментов и красителей; порошковая

металлургия; пластики и полимеры; нанесение покрытий; электроника; керамика; биотехнология, белки, фармацевтика; косметика; экология и др. [196]. Измерение размера частиц основано на использовании метода динамического светорассеяния DLS (Dynamic Light Scattering) или, иначе, Фоновой Корреляционной спектроскопии (ФКС), при котором измеряется интенсивность рассеянного света частицами образца и строится корреляционная кривая изменения интенсивности света за определенные установленные временные интервалы [197]. В процессе измерения луч лазера проходит через аттенюатор, попадает в кювету, а затем детектор регистрирует рассеянный частицами образца свет. Электрический сигнал детектора обрабатывается в программе по математическим алгоритмам, с помощью соотношения Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi\eta r}, \quad (2.1)$$

где D – коэффициент диффузии, k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость исследуемого образца, r – радиус частицы.

Аттенюатор нужен в данном случае для ослабления интенсивности света, падающего на образец луча, т.к. интенсивность рассеянного света может оказаться

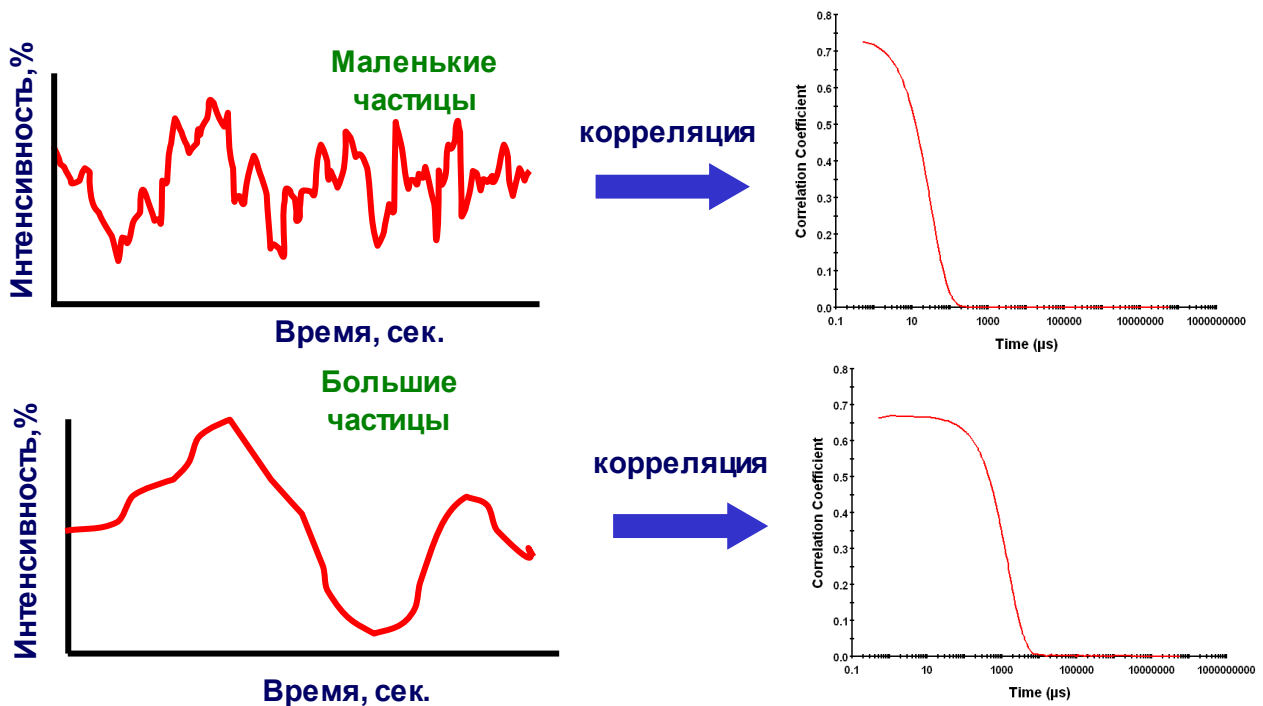


Рис.2.5. Схема автокорреляции измерений размера частиц в образце

вне пределов чувствительности детектора из-за излишней концентрации частиц в образце.

Интенсивность аттенюатора также высчитывается автоматически математическими алгоритмами программы. В результате измерений программа по отклонению луча, падающего на образец, обрабатывает полученные данные в виде автокорреляционной функции (рис. 2.5.). В зависимости от того, какого размера частицы присутствуют в растворе, такие флуктуации будут возникать на экране в программе.

Метод динамического светорассеяния ценен тем, что позволяет изучать живую систему, процессы агрегации, происходящие в ней. На рис. 2.6 представлено графическое изменение гидродинамического радиуса частиц, вычисляемого автоматически программой в процессе исследования образца. Значения гидродинамического диаметра менее 1 нм получены путем регистрации обратно рассеянного света под углом 173°C , что значительно увеличивает чувствительность данного метода ДСР. В традиционных ДСР анализаторах используется угол детектирования 90° . Оптическая конфигурация данного ДСР анализатора, использующая в своей основе детектирование обратно рассеянного излучения

образцов, позволяет проводить измерения образцов с более низкими концентрациями и меньшими размерами частиц. При обратном рассеянии под углом 173°C , рассеивающий объем в~8 раз превышает рассеивающий объем под углом в 90° . Это обуславливает 8-ми кратное увеличение регистрируемой скорости света, которая напрямую связана с чувствительностью

анализатора, или возможностью измерения малых частиц при низких концентрациях. Это достоинство прибора и то, что данный метод позволяет изучать

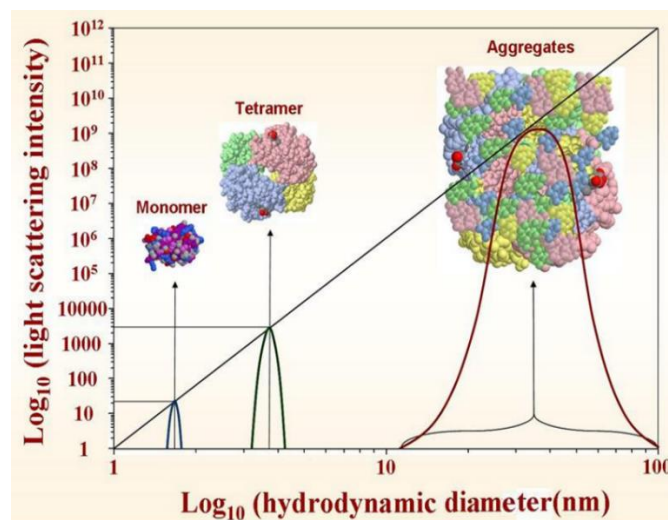


Рис. 2.6. Изменение гидродинамического радиуса частиц [196]

размеры частиц в вязкотекучем состоянии, позволили исследовать изменение размеров частиц в ходе процесса самоорганизации в низкоконцентрированном ЦСР и гидрогелях на его основе [196,198].

Кроме того, данный метод позволяет определять дзета-потенциал в исследуемых образцах. Методика определения дзета-потенциала основана на определении электрофоретической подвижности частиц. Для этого исследуемый образец помещают в специальной кювете в электрическое поле, под воздействием которого частицы перемещаются с определенной скоростью. Эту скорость определяют с помощью рассеяния света с фазовым анализом. В результате чего программа рассчитывает электрофоретическую подвижность, а из нее – дзета-потенциал.

2.2.5. Исследование процесса самоорганизации в цистеин-серебряном растворе и гелеобразования в системах на его основе методом кондуктометрии

Кондуктометрия является старейшим, самым простым и наименее селективным из электрохимических методов анализа. Кондуктометрический метод анализа основан на электрохимическом определении подвижности ионов в исследуемом образце под действием электрического тока, другими словами на измерении электропроводности растворов. Электропроводность раствора характеризует суммарное содержание всех ионов, растворенных в растворе. Это величина обратная сопротивлению:

$$\chi = \frac{1}{R}, \quad (2.2)$$

где R – сопротивление, χ – электропроводность.

Таким образом, единица измерения электропроводности Ом^{-1} или См/см . В качестве измерительных приборов используют кондуктометры (измерение электропроводности) или мосты переменного тока (измерение сопротивления).

Зависимость удельной электропроводности от концентрации электролита и подвижности ионов описывается следующим образом [199]:

$$\chi = F \cdot C \cdot (u_+ + u_-), \quad (2.3)$$

где F – постоянная Фарадея, равная примерно 96485 Кл/моль (заряд одного моля электронов), C – молярная концентрация (моль/л), $(u_+ + u_-)$ – электрофоретические подвижности (абсолютные скорости) катионов и анионов (в $\text{м}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$).

Электроды изготавливают из платины, платинированной платины (платина, покрытая платиновой чернью) или нержавеющей стали. Они должны быть одинаковыми, инертными, параллельно расположенными, жёстко закреплёнными



Рис.2.7. Кондуктометр «Seven Go PRO SG7» фирмы «Metler Toledo»

($l = \text{const}$), с одинаковой площадью поверхности ($S = \text{const}$) [200].

В данной работе использовали кондуктометр «Seven Go PRO SG7» фирмы «Metler Toledo» (рис.2.7). Это профессиональный кондуктометр для точного определения электропроводности, содержания и температуры растворов технологических

сред, растворов, активно использующийся в научных и производственных лабораториях. Прибор автоматически преобразует измеренную фактическую электропроводность в удельную электропроводность. Удельная электропроводность раствора – это электропроводность слоя раствора длиной 1 см между электродами площадью 1 см^2 . Кондуктометрический датчик – представляет с собой два электрода (иногда четыре), на которые подаётся напряжение, а кондуктометр измеряет силу тока и рассчитывает удельную электропроводность.

В данной работе кондуктометрическим методом анализа удалось исследовать процессы самоорганизации в ЦСР («созревание» раствора) и гелеобразования, а также зафиксировать момент образования вязкого гидрогеля, за счет уменьшения значения электропроводности путем встраивания ионов электролита в структуру геля.

2.2.6. Изучение процессов координирования катионов металлов в структуре гидрогеля на молекулярном уровне методом рН-метрии

рН-метрия – это один из ключевых методов *in situ* (от лат. «на месте») для анализа кинетики самоорганизации супрамолекулярных систем (например, ЦСР и гидрогелей), отслеживающий изменение концентрации при химических превращениях. Резкие изменения рН сигнализируют о протекании процесса гелеобразования в растворах, а в комплексе с УФ спектроскопией и ДСР метод позволяет судить о стабильности образующейся в результате структуры. В работе использовали рН-метр-милливольтметр «рН-410» фирмы «Аквилон» (рис.2.8). В качестве электрода использовали комбинированный электрод. Данный прибор позволяет определять водородный показатель, ЭДС электродной системы и температуры растворов, осуществлять непрерывный мониторинг ионов водорода,



Рис.2.8. рН-метр-милливольтметр «рН-410» фирмы «Аквилон»

что позволяет изучать процессы самоорганизации в ЦСР и гидрогелях в реальном времени. Благодаря комплексному подходу, данные, полученные с помощью рН-метрии, позволяют сочетать ее с другими методами исследования, такими как УФ спектроскопия, ДСР, вискозиметрия и использовать для определения времени гелеобразования и устойчивости структур. В результате это позволяет установить прямую связь между изменением кислотности среды (резкие скачки рН) и кинетикой перехода

системы из истинного раствора в супрамолекулярный гель.

2.2.7. Анализ морфологии получаемых гидрогелей методом сканирующей электронной микроскопии

Для исследования морфологии образцов использовали сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) JEOL 6610 LV (JEOL Ltd., Токио, Япония) (рис.2.9). Все эксперименты проводились в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Использовались сигналы вторичных электронов низких энергий, обеспечивающие топографический контраст, и высокоэнергетические обратно-рассеянные (отраженные) электроны, определяющие состав и фазовое состояние.



Рис.2.9. Сканирующий электронный микроскоп JEOL 6610 LV (JEOL Ltd., Токио, Япония)

Данный метод широко применяется для исследования морфологии полимеров, пористых образцов, биополимеров и др. объектов. С помощью СЭМ можно исследовать поверхность образующейся гель-сетки в гидрогелях и получать микрофотографии с высоким разрешением. Исследования на сканирующем электронном микроскопе проводили на базе ЦКП ТвГУ Физико-технического университета. Важным достоинством данного микроскопа является возможность совмещения с системой

элементного анализа.

2.2.8. Изучение элементного состава получаемых гидрогелей методом рентгеноспектрального электронно-зондового анализа

Для исследования элементного состава образцов использовали систему энергодисперсионного рентгеновского микроанализа Oxford INCA Energy 350 (JEOL Ltd., Токио, Япония), совмещенную со сканирующим электронным микроскопом. Для установления элементного химического состава образцов ЦСР

и гидрогелей на его основе применялся метод рентгеноспектрального микроанализа, основанный на регистрации и анализе энергетических спектров характеристического рентгеновского излучения, возбуждаемого электронами при прохождении через образец. Подготовка образцов включала нанесение на их поверхность тонкого проводящего слоя платины и последующую сушку в вакууме (10^{-4} Па). Средняя продолжительность напыления платины составляла 5 минут.

2.2.9. Анализ морфологии получаемых гидрогелей методом просвечивающей электронной микроскопии

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) – один из важных методов изучения строения сложных супрамолекулярных систем, полимеров, биомолекул (белков, бактерий). Данный метод основан на получении изображения с помощью проходящего через образец пучка электронов. В результате просвечивания электронным пучком образца, происходит неоднородное поглощение электронов разными участками образца, что дает двумерную картину распределения



Рис. 2.10. Просвечивающий электронный микроскоп LEO 912 AB OMEGA фирмы «Carl Zeiss»

плотности - микрофотография ПЭМ. Микрофотографии гидрогелей и ЦСР, исследуемые в данной работе, получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) LEO 912 AB OMEGA фирмы «Carl Zeiss» (рис. 2.10) на базе ЦКП Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Образцы предварительно подготавливали к исследованию путем нанесения на полимерную подложку из формвара. Разрешение изображения данного просвечивающего электронного микроскопа 0,2 – 0,34 нм, что позволяет получить качественные микрофотографии исследуемых образцов, на которых четко различима структура образующейся гелевой сетки.

2.2.10. Микробиологическая активность исследуемых гидрогелей, и их способность к подавлению роста раковых клеток

Исследование микробиологической активности и подавление роста опухолевых клеток – в настоящее время является одной из самых актуальных тем исследования современных ученых. Получение положительного результата в данном направлении может дать развитие огромной отрасли медицины. В данной работе использовались коммерчески доступные стандартные культуры клеток человека: две линии раковых клеток и две линии нормальных (здоровых) клеток человека.

Линии раковых клеток:

- клетки плоскоклеточной карциномы шейки матки человека SiHa были получены из Американской коллекции клеточных культур (ATCC, номер по каталогу HTB-35, Манассас, штат Вирджиния, США);
- MCF-7 – эпителиоподобные клетки, выделенные из инвазивной аденокарциномы молочной железы женщины.

Линии здоровых клеток человека:

- линия HaCaT (спонтанно трансформированная анеуплоидная иммортализованная линия кератиноцитов кожи взрослого человека) — от компании Amsbio (номер по каталогу AMS.CL-0090, Милтон, Великобритания);
- нормальные эмбриональные фибробласты легкого человека WI-38 (ATCC, Манассас, штат Вирджиния, США; номер партии CCL-75).

Клеточные линии высевали в 96-луночные планшеты и культивировали во флаконах Corning площадью 25 см² в течение 24 ч при температуре 37 °C в атмосфере с 5% содержанием CO₂ в 4 мл среды DMEM (модифицированная среда Игла по методу Дульбекко; PanEco, Москва, Россия) с добавлением L-глутамина (2 mM), 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Diaem, номер партии FBS500SA, Москва, Россия) и антибиотиков (пенициллин в концентрации 50 Ед/мл и стрептомицин 50 мкг/мл, и в концентрации 100 Ед/мл, стрептомицин — 100 мкг/мл; PanEco, Москва, Россия,). Затем клетки инкубировали в течение 48 ч в среде,

содержащей испытуемые соединения в различных концентрациях. В культуральную среду добавляли раствор МТТ (5 мг/мл) на основе фосфатно-солевого буфера (PBS) (10 мкл/лунка), после чего клетки инкубировали при 37 °С в течение 4 ч. В процессе клеточного дыхания желтый бромид тетразолия (МТТ) восстанавливается до фиолетового формазана. Пересев и деление клеток проводили 2–3 раза в неделю. Для снятия клеток монослой обрабатывали раствором Версена (PanEco, Москва, Россия), а затем раствором трипсина (Gibco, Уолтем, штат Массачусетс, США). Действие трипсина останавливали добавлением культуральной среды DMEM с содержанием 10% сыворотки. Культуральную среду удаляли, а в каждую лунку вносили ДМСО (100 мкл). Планшет встряхивали в течение 20 мин с частотой 250 колебаний в минуту при комнатной температуре, после чего измеряли оптическую плотность в каждой лунке при длине волны 570 нм с помощью планшетного ридера Multiskan Spectrum (Thermo Scientific, Уолтем, штат Массачусетс, США). Подсчет клеток осуществляли с помощью прибора Vi-Cell™ XR (Beckman Coulter, Бреа, штат Калифорния, США). Для подсчета готовили суспензию отдельных клеток в соотношении 1:10 (100 мкл клеточной суспензии на 900 мкл среды). Результаты МТТ-теста усредняли на основе данных трех независимых экспериментов, в каждом из которых проводилось три параллельных измерения. Показатели МТТ-теста в отсутствие испытуемых соединений принимали за 100% жизнеспособность клеток.

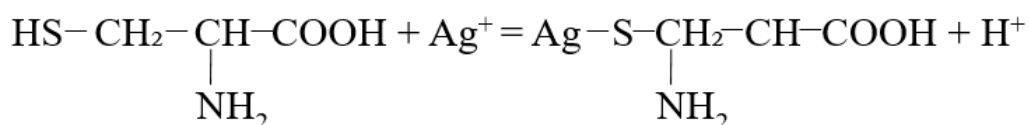
Данные клетки не подвергались дополнительной генетической модификации; они использовались исключительно в качестве моделей нормальных или опухолевых клеток для оценки цитотоксичности исследуемых гелей. Работа проводилась на базе научного центра ИБМХ РАН им. В.Н. Ореховича, г. Москва.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗМЕРЕНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

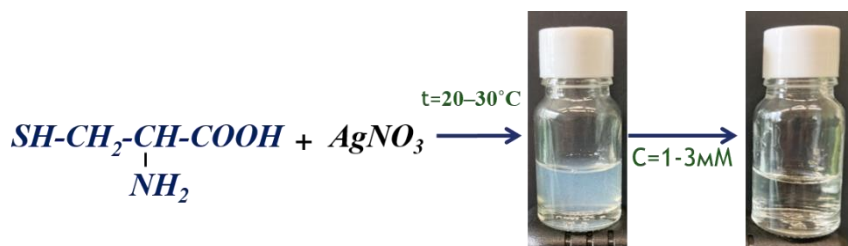
3.1. Исследование процесса самоорганизации в ЦСР

3.1.1. Определение энергии активации процесса самоорганизации в ЦСР методом УФ спектроскопии

Методика приготовления цистеин-серебряного раствора осуществляется в две стадии: 1) формирование меркаптида (тиолята) серебра и 2) процесс «созревания» ЦСР. Первая стадия заключается во взаимодействии L-цистеина с нитратом серебра, при котором тиольная группа аминокислоты практически мгновенно связывается с ионами Ag^+ , приводя к образованию молекул меркаптида (тиолята) серебра [148]. Раствор в результате становится мутным, опалесцирующим, бело-голубого цвета. Механизм образования меркаптида (тиолята) серебра (МС) можно представить в виде следующей реакции:



Формирование цепочек из молекул МС происходит за счет донорно-акцепторного взаимодействия между атомами серы и серебра. При этом происходит увеличение



кислотности раствора за счет высвобождения ионов водорода, что подтверждается

Рис.3.1. Процесс самоорганизации в ЦСР (схема)

результатами рН-метрии.

Так рН исходных

растворов AgNO_3 и L-цистеина равен 5,33 и 4,60 соответственно. Однако, при смешении растворов значение рН существенно снижается и в готовом («созревшем») ЦСР равно 2,62.

На второй стадии – начинается процесс «созревания» ЦСР. В ходе этого процесса происходит координирование молекул меркаптида (тиолята) серебра

между собой с образованием супрамолекулярных цепочек. Раствор на некоторое время помещают в темное место (во избежание попадания дневного света на образец), в течение которого раствор становится прозрачным светло-желтого цвета (рис.3.1). В результате проведенных исследований установлено, что для проведения синтеза ЦСР необходимо соблюдение ряда неотъемлемых условий:

- 1) Наличие определенного концентрационного соотношения исходных веществ (L-цистеина к нитрату серебра) [201];
- 2) Соблюдение определенной температуры, временных рамок и нахождение раствора в ходе процесса «созревания» в темном месте.

Таким образом, схематично весь процесс самоорганизации в ЦСР, проходящий в две стадии, можно представить следующим образом (рис.3.2).

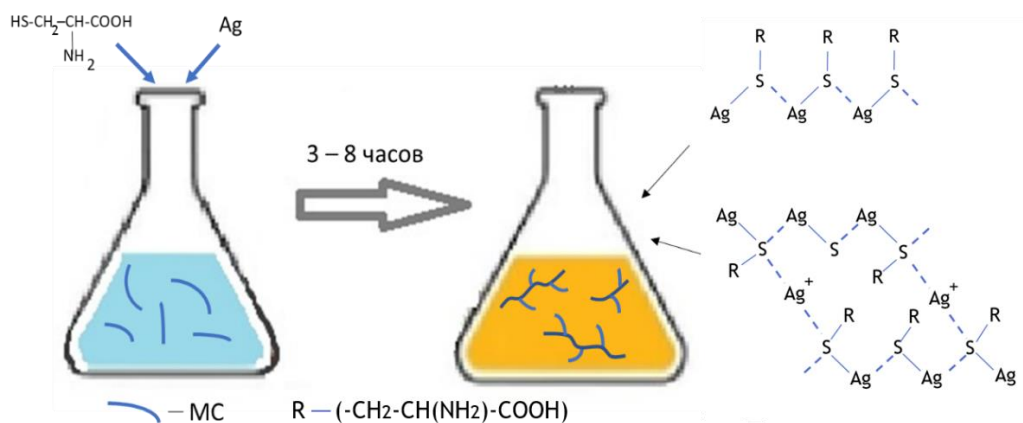


Рис. 3.2. Схематическое представление образования супрамолекулярных цепочек из молекул MC в ЦСР [202]

Исследования процесса самоорганизации в ЦСР проводили при мольном соотношении L-цистеина к нитрату серебра [190]: в диапазоне 1,00/1,25 – 1,00/1,27. В ходе дальнейших исследований было выбрано рабочим соотношением 1,00/1,25 в виду отсутствия разницы между результатами двух соотношений (1,25 и 1,27).

В ходе исследований установлено, что избыточное содержание ионов серебра необходимо, т.к. участвует в формировании супрамолекулярных цепочек (рис.3.2). Доказательством этого служило появление и рост интенсивности УФ полос поглощения 310 и 390 нм [203]. Данные полосы поглощения отвечают образованию комплексов с переносом заряда при формировании супрамолекулярных цепей (рис.3.3).

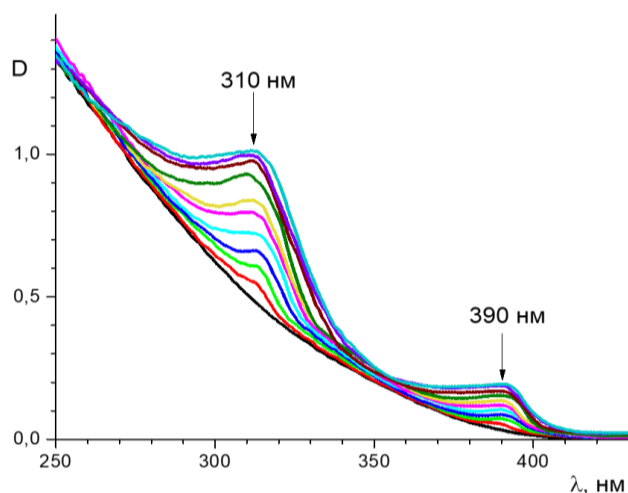


Рис. 3.3. Изменение интенсивности УФ полос поглощения при 310 и 390 нм в зависимости от времени нахождения ЦСР в состоянии покоя при $T=25^{\circ}\text{C}$ от начального (черный цвет) до конечного состояния $t=280$ мин (голубой цвет).

Изменение интенсивности обеих полос происходит симбатно. На рис.3.3. представлен процесс «созревания» ЦСР при $T=25^{\circ}\text{C}$.

Исследование проводили в течение 280 мин., до прекращения роста полос поглощения 310 и 390 нм. В ходе работы установлено, что на время «созревания» ЦСР оказывает влияние температура окружающей среды. Для изучения кинетики процесса самоорганизации была выбрана УФ полоса поглощения при

310 нм, как наиболее интенсивная. Ее интенсивность характеризует число донорно-акцепторных связей в образующихся супрамолекулярных цепях из молекул МС.

Изучение кинетики процесса осуществляли в диапазоне температур от 10 до 55°C . При приближении к температуре $10-15^{\circ}\text{C}$ процесс самоорганизации резко тормозился, а при температурах выше 45°C - проходил практически мгновенно.

Нам удалось получить кинетические зависимости изменения интенсивности полосы 310 нм при температурах 10, 15,

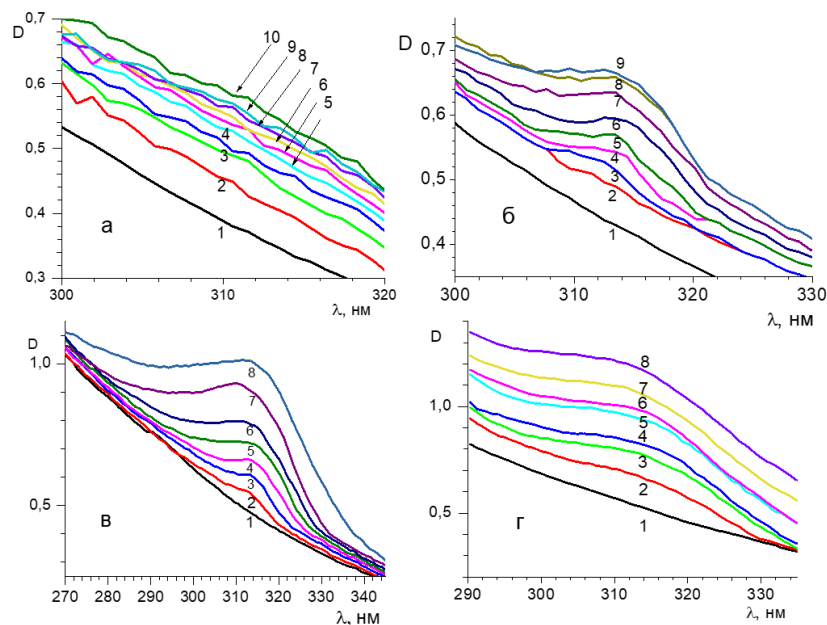


Рис. 3.4. Изменение величины оптической плотности полосы поглощения 310 нм для ЦСР ($C_{\text{cys}} = 1 \text{ mM}$; $C_{\text{AgNO}_3} = 1,25 \text{ mM}$) в зависимости от времени при различной температуре: а – 10, б – 15, в – 25, г – 28°C : 1 (1); 30 (2); 60 (3); 90 (4); 120 (5); 150 (6); 210 (7); 280 (8); 300 (9); 330 мин (10)

25, 28, 35, 45, 50 и 55°C. Рис. 3.4 и рис. 3.5 демонстрируют кинетику изменения интенсивности полосы поглощения 310 нм в процессе созревания ЦСР при различной температуре [202]. Установлено, что при $T=10^{\circ}\text{C}$ рост полосы 310 нм спустя 5,5 ч так и не достиг максимума. При увеличении температуры на 5°C начинается небольшой рост полосы 310 нм, однако, максимума интенсивности полоса также не достигает. При $T=25^{\circ}\text{C}$ и 28°C процесс «созревания» проходил в

течение 180 мин. При дальнейшем увеличении температуры время «созревания» ЦСР существенно сокращалось (рис.3.5). Нам удалось получить кинетические зависимости изменения величины D при температурах от 10 до 55°C (рис.3.6). Для определения энергии активации процесса «созревания» в ЦСР на полученных кривых использовали начальные участки от 0 до 30 мин. (рис. 3.6 б). На данных участках измерения проводили каждую минуту так, что в результате для проведения аппроксимации имелся достаточный объем точек (30 шт.), Константу скорости процесса самоорганизации k для каждой кинетической кривой определяли, как тангенс угла наклона касательной, проведенной из начала координат (рис. 3.6, кривая 3). Из рисунка видно, что кинетические кривые изменения оптической плотности нельзя описать уравнением реакции 1-го порядка, то есть экспоненциальным законом, особенно при высоких температурах.

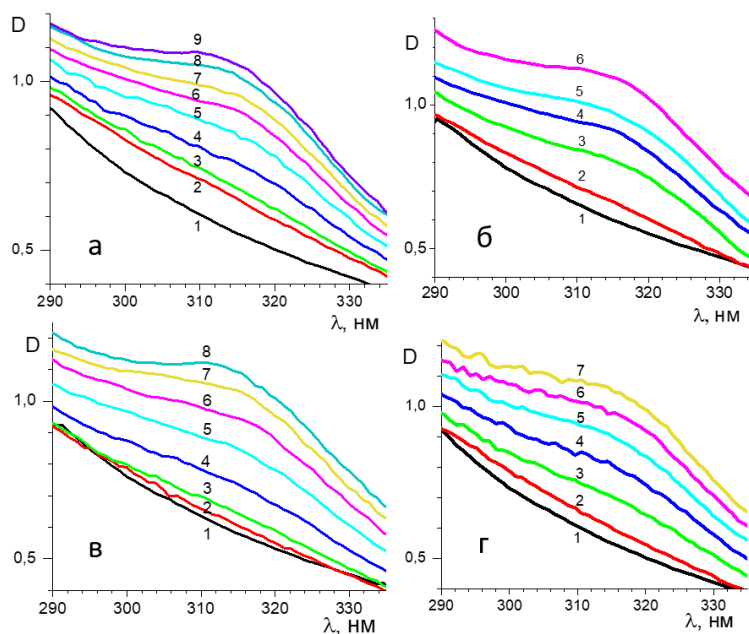


Рис. 3.5. Изменение величины оптической плотности полосы поглощения 310 нм для ЦСР ($C_{\text{cys}} = 1 \text{ mM}$; $C_{\text{AgNO}_3} = 1,25 \text{ mM}$) в зависимости от времени при различной температуре: а – 35°C : 1 (1); 2 (2); 3 (3); 5 (4); 6 (5); 7 (6); 8 (7); 10 (8); 13 мин (9); б – 45°C : 1 (1); 2 (2); 3 (3); 4 (4); 5 (5); 6 мин (6); в – 50°C , г – 55°C : 1,00 (1); 2,00 (2); 2,25 (3); 2,50 (4); 2,75 (5); 3,00 (6); 3,50 (7); 4 мин (8), $d = 1 \text{ mm}$

Поэтому, с помощью уравнения Аррениуса (1) была определена кажущаяся энергия активации самоорганизации в ЦСР.

На рис. 3.7 представлена зависимость логарифма константы скорости (2) процесса самоорганизации от обратной абсолютной температуры ($1/T$). Видно, что экспериментальные точки укладываются на прямую. С другой стороны, уравнение Аррениуса можно записать, как

уравнение прямой (3.1) и рассчитать из линейной зависимости (3.2), при умножении $\tan$ угла наклона (3.3) на универсальную газовую постоянную (R), кажущуюся энергию активации процесса «созревания» ЦСР: $E_a = (90,0 \pm 2,0)$ кДж/моль.

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (3.1); \quad \ln k = f\left(\frac{1}{T}\right) \quad (3.2);$$

$$\tan a = -\frac{E_a}{R}, \quad (3.3)$$

где E_a – энергия активации (кДж/моль), R – универсальная газовая постоянная, равная 8,31 (Дж/моль·К), T – температура (К).

Зная тангенс угла наклона прямой на рис.3.7, можно определить кажущуюся энергию активации процесса самоорганизации в ЦСР. Грубые оценки показали, что кажущаяся энергия активации процесса составляет $E_{a_{310\text{нм}}} \approx 90,0 \pm 2,0$ кДж/моль.

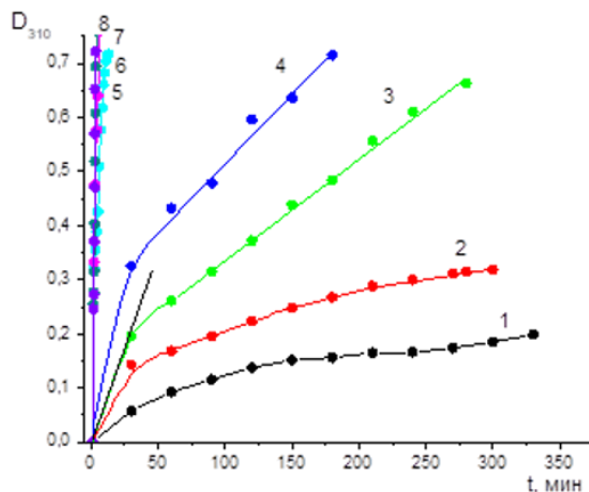


Рис.3.6. Кинетическая зависимость оптической плотности УФ полосы поглощения 310 нм при разных температурах 1 – 10, 2 – 15, 3 – 25, 4 – 28, 5 – 35, 6 – 45, 7 – 50, 8 – 55 °С в течение всего времени исследования процесса «созревания», $d=1$ мм.

Подобные расчеты провели и с полосой поглощения 390 нм. В результате установлено, что кажущаяся энергия активации процесса «созревания», вычисленная по полосе 390 нм, составляет $E_{a390\text{нм}}=90,42$ кДж/моль. Таким образом, по рассчитанному значению энергии активации процесса «созревания» можно сделать вывод, что данные полосы

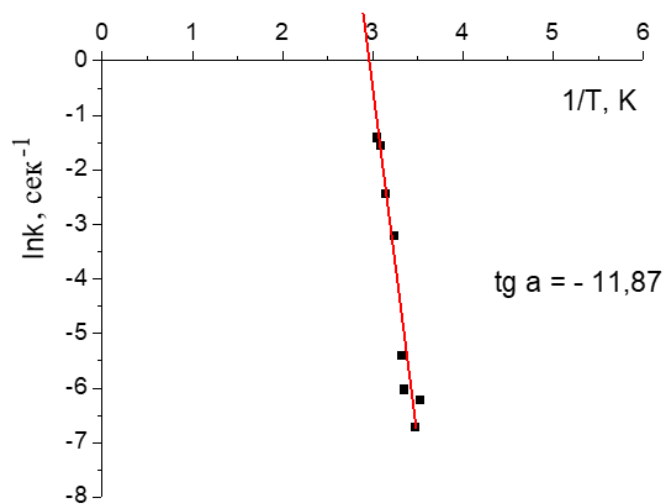


Рис.3.7. Зависимость константы скорости от температуры ($1/T$)

поглощения соответствуют супрамолекулярному структурированию, происходящему в ходе процесса самоорганизации ЦСР, и свидетельствуют об участии межмолекулярных взаимодействий (координационных донорно-акцепторных, превалирующих над остальными типами взаимодействий).

3.1.2. Изучение процесса самоорганизации в ЦСР методом кондуктометрии и динамического светорассеяния

Полученные данные хорошо коррелируют с данными кондуктометрического исследования процесса «созревания» ЦСР (рис.3.8). Установлено, что в начальный момент времени (1 мин.) значение удельной электропроводности в ЦСР составляет $\chi=1245$ мСм/см, затем, спустя мин., происходит постепенное уменьшение значения удельной электропроводности, переходящее в плато при $\chi=551$ мСм/см, что свидетельствует об окончании процесса самоорганизации в ЦСР. Кроме того, установлено, что вязкость ЦСР со временем увеличивается. Так на момент окончания процесса «созревания» вязкость ЦСР составляла 4,5-4,8 отн.ед. Через месяц вязкость ЦСР увеличилась до значения 8,2-8,6 отн.ед. Затем спустя 77 дней вязкость ЦСР составила 9,8 отн.ед. [204].

Гидрогели, полученные на основе данного ЦСР, также имели большую вязкость по сравнению с гидрогелями, полученными на основе свежеприготовленного ЦСР.

Методом ДСР был определен размер кластеров меркаптида серебра, образующихся в процессе «созревания» ЦСР. Так на рис.3.9 представлено распределение частиц по размеру в цистеин-серебряном растворе, из которого видно, что в

ходе процесса «созревания» ЦСР происходит небольшое увеличение размеров частиц в растворе от 50 нм (1 пик) до 100 нм (5 пик). Смещение в сторону больших размеров частиц и увеличение ширины моды (пика) свидетельствует об

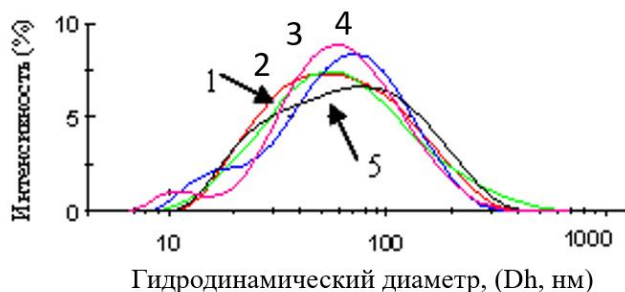


Рис.3.9. Распределение частиц по размеру в процессе созревания ЦСР: 30 (1), 60 (2), 90 (3), 120 (4), 180 мин (5).

образовавшихся в ходе процесса самоорганизации в ЦСР, составил +60 мВ.

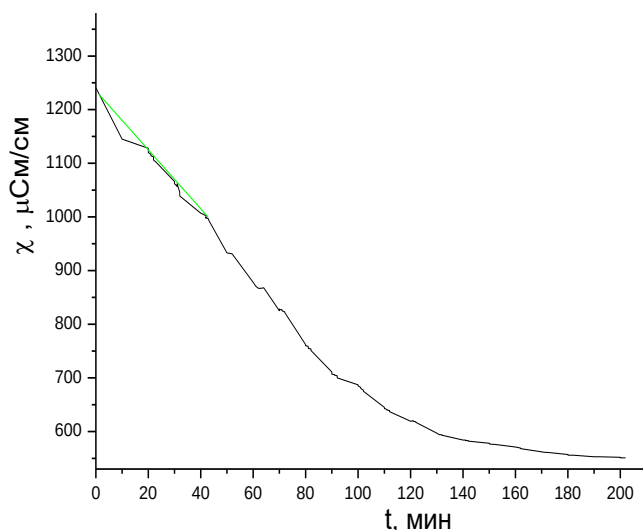


Рис.3.8. Изменение удельной электропроводности в ЦСР во времени, $T=25^{\circ}\text{C}$

образовании большого количества кластеров размером ~ 50 нм, их сцеплении и образовании крупных по размеру кластеров ~ 100 нм. Установлено, что оптимальный размер частиц для «созревшего» ЦСР приблизительно равен $\sim 80-100$ нм [148]. Дзета-потенциал частиц,

3.1.3. Изучение процесса самоорганизации в цистеин-серебряном растворе методом ИК-спектроскопии

Данные, полученные методом ИК спектроскопии, подтвердили результаты, полученные описанными выше физико-химическими методами исследования. Установлено, что в ИК-спектрах (рис. 3.10) практически отсутствуют полосы,

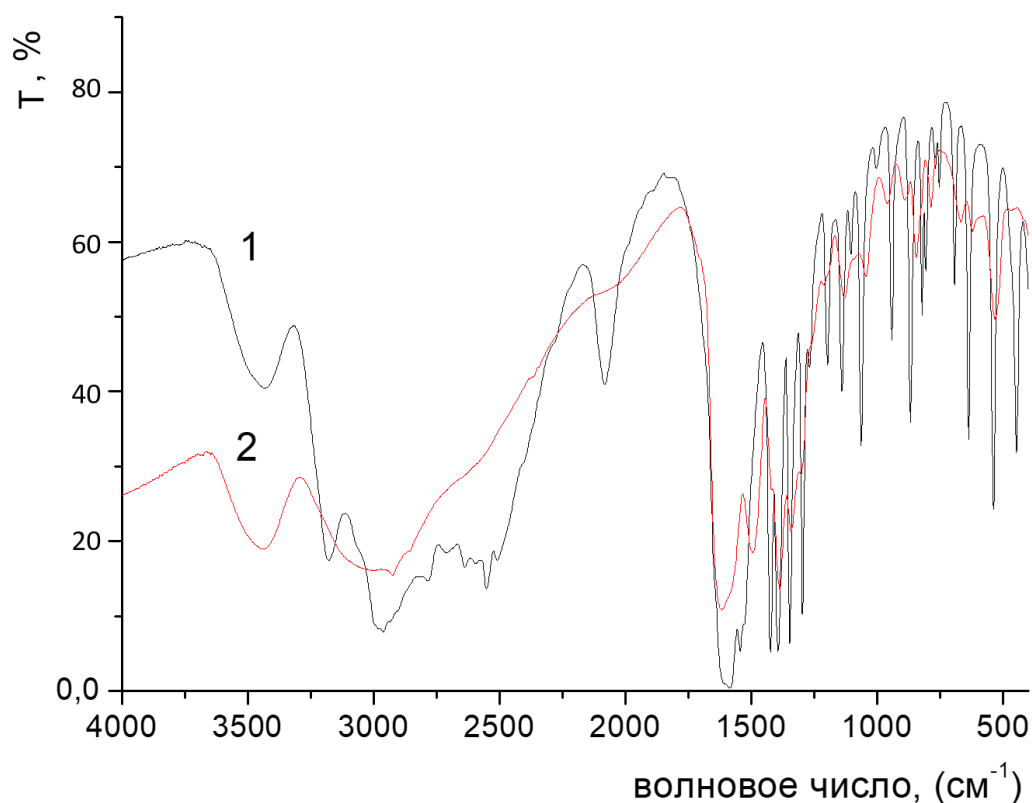


Рис. 3.10. ИК спектр пропускания L-цистеина (1), ЦСР (2)

относящиеся к валентным колебаниям тиольной группы $\nu(\text{SH})$ в областях 2100 и 2550 см^{-1} и характерные для молекулы L-цистеина. Это свидетельствует о том, что тиольные группы цистеина взаимодействуют с ионами серебра с образованием меркаптида серебра (цвиттер-ионов меркаптида серебра в растворе), которые в процессе созревания раствора связываются друг с другом, образуя супрамолекулярные цепи, что доказывает предложенный механизм образования МС в процессе «созревания» ЦСР при смешении исходных растворов L-цистеина и нитрата серебра. Также деформационные колебания связи $\delta(\text{SH})$ проявляются в низкочастотной (скелетной) области спектра L-цистеина (1) в диапазоне 900–600 см^{-1} , однако, на спектре ЦСР они имеют очень слабую интенсивность и

трудноразличимы на фоне других полос. Таким образом, ИК спектроскопическим методом подтвердили, что одной из стадий самоорганизации в ЦСР является образование олигомерных цепей меркаптида (тиолята) серебра.

3.2. Исследование процесса гелеобразования в ЦСР

3.2.1. Установление концентрационного диапазона исследуемых систем визуальным методом исследования

Установлено, что при введении в «созревший» ЦСР электролитов начинается процесс гелеобразования. В качестве электролитов использованы соли (хлориды, сульфаты, нитраты, фторид, бромид, иодид) биоактивных металлов разной валентности: одновалентные (Na^+ , K^+), двухвалентные (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) и трехвалентные (Al^{3+}). Изменение вязкости в образующихся гидрогелях оценивали с помощью пятибалльной шкалы, описанной в методах исследования. Таким образом, с помощью полученных диаграмм установили концентрационный диапазон образования вязкого гидрогеля для каждого электролита (рис.3.11). Процесс формирования гидрогелей под действием хлоридов и сульфатов металлов протекал достаточно быстро (5–10 мин) [205], кислотность среды при этом составляла $\text{pH} < 3$, поэтому гидролизом амфотерных солей можно пренебречь, т.к. гидролиз хлорида алюминия проходит в три стадии, в результате которого образуются ионы водорода, и среда сохраняет кислые свойства [148]. Из диаграмм видно, что концентрационный диапазон для наиболее «вязкого» состояния гидрогеля, оцененного в 5 баллов, варьируется в зависимости от катиона металла. Влияние концентрации вводимого в ЦСР электролита на вязкость образующихся гидрогелей показало, что наибольшее значение вязкости для гидрогеля с NaCl наблюдалось при концентрации электролита в диапазоне 3.10 – 4.07 мМ, для геля с CuCl_2 при концентрации 0.63–1.78 мМ, а для геля с AlCl_3 при концентрации 3.6–4.1 мМ [191].

В то время как для сульфатов этих же катионов металлов концентрационный

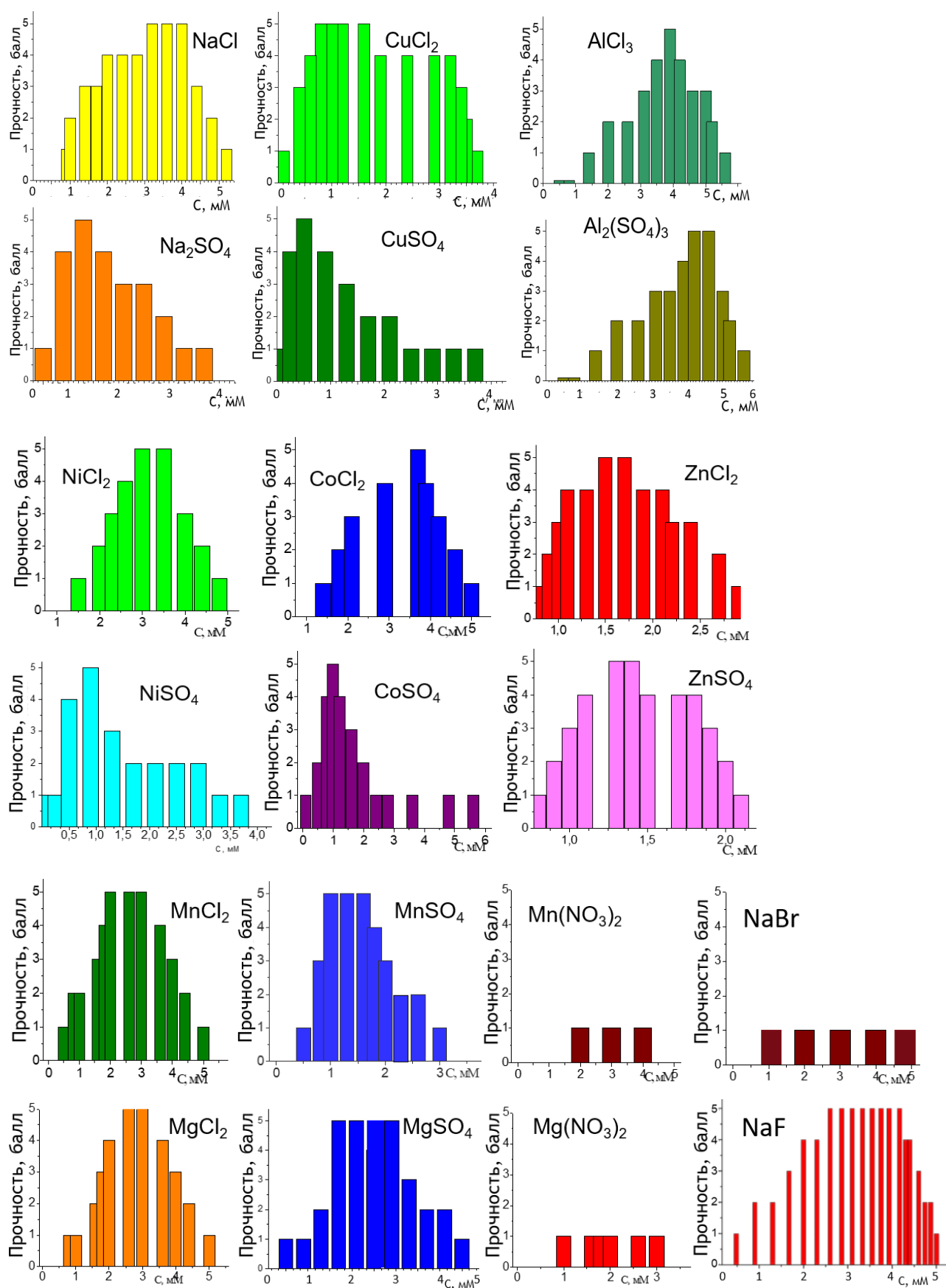


Рис. 3.11. Гистограммы прочности гидрогелей на основе ЦСР по пятибалльной шкале в зависимости от концентрации вводимого электролита

диапазон смещается в сторону меньших значений концентраций. Так, для гидрогеля с однозарядным катионом (сульфатом натрия) наибольшей вязкостью в 5 баллов гидрогель обладает при добавлении 1,15 – 1,45 мМ электролита в ЦСР (рис. 3.11), в то время как для хлорида натрия этот интервал составлял 3.10 – 4.07 мМ [191]. Это различие обусловлено влиянием именно аниона на процесс гелеобразования: сульфат-анион больше размером, чем хлорид-анион, и вносит дополнительное связывание в процесс структурирования ЦСР с катионом натрия. Эта тенденция прослеживается для всех электролитов, кроме Al^{3+} , что связано, скорее всего с его амфотерными свойствами. Однако, сульфаты двухзарядных катионов металлов между собой тоже отличаются в значениях концентрационных диапазонов, соответствующих образованию вязкого пятибалльного гидрогеля. Прослеживается закономерность между диаграммами прочности гидрогелей, образованных сульфатами никеля, кобальта и меди, что, возможно, связано со схожей природой комплексообразования данных катионов металлов. Так, для сульфата марганца (рис.3.11) такой гидрогель образуется в диапазоне 0,80-1,75 мМ, для сульфата магния – 1,60-2,10 мМ, для $CoSO_4$ – 0,82-1,30 мМ, для $NiSO_4$ – 0,80-2,10 мМ, а для $CuSO_4$ – 0,40-0,70 мМ [191]. Таким образом, наибольшие значения вязкости при меньших концентрациях электролита в ЦСР у гидрогеля с $CuCl_2$ и $CuSO_4$, что связано с проявлением комплексообразующих свойств данного катиона металла, и встраиванием его в структуру гидрогеля в виде комплекса. Однако, с нитратами тех же металлов гидрогель не образовывался. Это доказывает то, что для образования прочного гидрогеля необходимо участие аниона, отличающегося от аниона, входящего в состав исходного вещества $AgNO_3$.

В результате проведенного исследования можно вывести закономерность образования вязкого гидрогеля от концентрационного диапазона и расположить катионы металлов в зависимости от их концентрации в следующей последовательности (по возрастанию): для хлоридов металлов Cu^{2+} – Zn^{2+} – Mn^{2+} – Mg^{2+} – Ni^{2+} – Na^{+} – Co^{2+} – K^{+} – Al^{3+} и для сульфатов металлов Cu^{2+} – Mn^{2+} – Ni^{2+} – Co^{2+} – Na^{+} – Zn^{2+} – Mg^{2+} – Al^{3+} . В основном сохраняется общая последовательность в обеих выведенных зависимостях, исключение составляют сульфат магния и цинка,

которые имеют большие значения концентрации по сравнению с хлоридами этих же металлов. Стоит заметить, что все гидрогели, образованные сульфатами исследуемых металлов, показывали большую устойчивость вязкостных свойств во времени (14-18 дней), чем гидрогели, образованные хлоридами металлов (7-10 дней), исключением стал гидрогель с хлоридом меди – вязкость которого сохранялась в течение 35 дней. При сравнении с NaCl и AlCl₃ можно выстроить следующую последовательность: CuCl₂ (35 дней) – NaCl (7 дней) – AlCl₃ (3 дня). Это связано с тем, что данные катионы металлов обладают разной силой координирования, так, Cu²⁺ является более сильным комплексообразователем. А разница в концентрационном диапазоне прочности гидрогелей между сульфатом и хлоридом одного и того же металла говорит о том, что в процессе гелеобразования участвуют не только катионы, но и анионы электролитов, а также что сульфат-анион вносит дополнительное связывание в структуру гель-сетки.

3.2.2. Проведение реологических исследований изменения вязкости в ходе процесса гелеобразования методом вибрационной вискозиметрии

Установлено что значение вязкости гидрогеля существенно зависит от заряда вводимого в раствор катиона металла. Нами были выбраны для сравнения в качестве однозарядного катиона NaCl, двухзарядного CuCl₂ и трехзарядного AlCl₃. Так, при введении в ЦСР электролитов одинаковой концентрации (3,0 мМ) для NaCl вязкость через 60 мин составляла 9,3; CuCl₂ ~ 6,8 и для AlCl₃ ~ 7,5 отн.ед., по сравнению с вязкостью 4,0 отн.ед. для созревшего ЦСР (рис.3.12). Изменение вязкости для гидрогеля с хлоридом меди отличается от других электролитов и при увеличении концентрации вязкость уменьшается, что соответствует данным гистограммы зависимости концентрационного диапазона от прочности гидрогеля для данного электролита, оцененного по пятибалльной шкале. Это, по-видимому, обусловлено тем, что именно прочность непрерывного каркаса пространственной

сетки из слабо связанных частиц дисперсной фазы зависит от комплексообразующей способности вводимых в ЦСР катионов металлов.

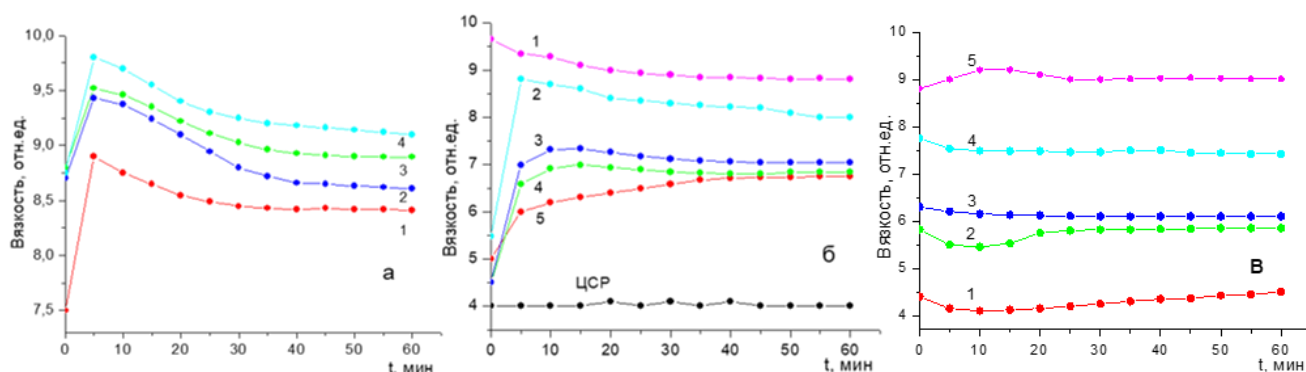


Рис.3.12. Изменение динамической вязкости гидрогелей на основе ЦСР во времени (в течение 60 мин) при введении NaCl (а), CuCl₂ (б) и AlCl₃ (в) разной концентрации: 1,5 (1), 2,0 (2), 2,5 (3), 3,0 (4) и 3,5 mM (5); T=27°C

Вязкость образующихся гелей, как видно из рис.3.12, резко возрастает в начальный момент при добавлении электролита в ЦСР и затем в течение 5-10 мин достигает максимального значения. При этом наибольшая вязкость достигается для гидрогелей с CuCl₂~9,2 отн.ед [148]. При сравнении вязкости гидрогеля с трехзарядным электролитом (рис.3.12в) установлено, что для достижения максимальной вязкости необходима концентрация намного больше, чем для NaCl. Что также подтверждает данные концентрационных зависимостей (рис.3.11) и, в результате, установленную последовательность электролитов CuCl₂ → NaCl → AlCl₃. При сравнении одно-, двух- и трехзарядных электролитов можно судить о том, что увеличение вязкости в гидрогелях лучше у хлорида меди. Это, скорее всего, связано с тем, что сила комплексообразования у Cu²⁺ больше, чем у Na⁺ и Al³⁺. Хотя динамическая вязкость гидрогеля с AlCl₃ является более стабильной во времени, по сравнению с однозарядным хлоридом натрия. Возможно в данном случае, при механическом воздействии произошло координирование Al³⁺ в более прочные комплексы, чем с Na⁺.

На рис. 3.13а представлены кинетические кривые изменения вязкости ЦСР при добавлении хлоридов металлов в концентрации (1,0 mM). Легко заметить, что вязкость образующихся гелей также резко возрастает в начальный момент при добавлении электролита в ЦСР и затем в течение 5-10 мин выходит на насыщение.

Уменьшение концентрации в 3 раза привело к эквивалентному уменьшению вязкости исследуемых гидрогелей. При этом сохраняется установленная

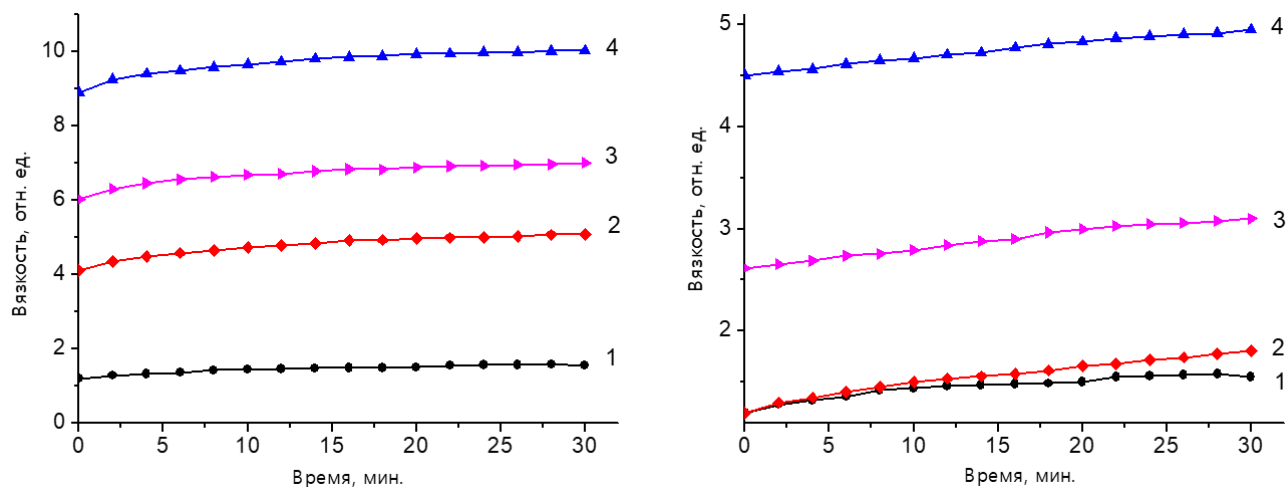


Рис. 3.13. Кинетические кривые изменения вязкости гелей (а) и механически разрушенных гелей (б): ЦСР (1), ЦСР/NaCl (2), ЦСР/AlCl₃ (3), ЦСР/CuCl₂ (4), концентрация электролита и ЦСР 1,0 мМ [148].

закономерность, и наибольшая вязкость также соответствует гидрогелю с CuCl₂. Для сравнения все электролиты использовали в одной концентрации 2,7 мМ. Вязкость механически разрушенных гелей с CuCl₂ и AlCl₃ остается выше по сравнению с гелем на основе NaCl и с ЦСР, а вязкость разрушенного геля с NaCl

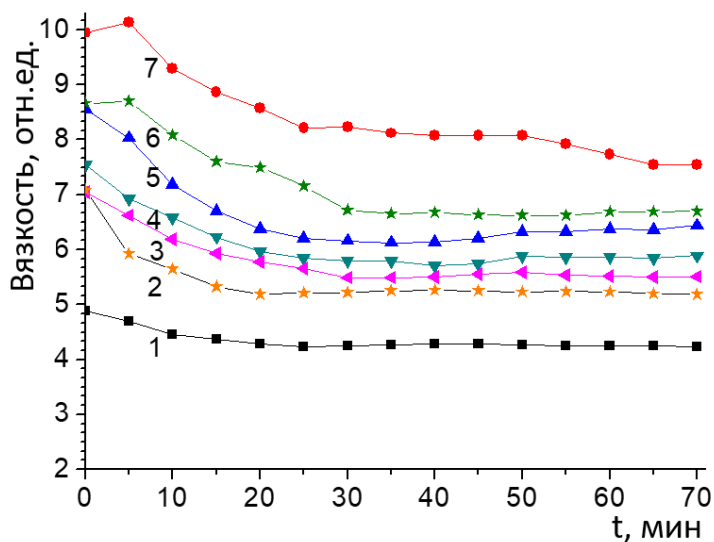


Рис.3.14. Изменение динамической вязкости гидрогелей на основе ЦСР (1) во времени при введении сульфатов исследуемых металлов: Na₂SO₄ (2), MgSO₄ (3), MnSO₄ (4), NiSO₄ (5), CoSO₄ (6), CuSO₄ (7); T=27°C [191]

близка к вязкости исходного ЦСР (рис. 3.13б) [148]. Со временем вязкость разрушенных гелей начинает медленно нарастать. Такое поведение можно объяснить большей координирующей способностью катионов меди.

При изучении вязкости гидрогелей с сульфатами металлов было установлено, что гидрогель с Na₂SO₄ имеет вязкость (~5,5 отн.ед.), а

гидрогель с сульфатом магния ($\sim 5,8$ отн.ед.) (рис.3.14 а,б). Это связано, вероятно, с тем, что Na^+ и Mg^{2+} в электрохимическом ряду активности металлов стоят рядом, однако, магний проявляет более активное участие в структурировании гидрогеля за счет степени комплексообразования +2. Наибольшей динамической вязкостью обладал гидрогель с сульфатом меди, что можно объяснить большей силой комплексообразования катиона меди по сравнению с другими представленными катионами металлов [191]. В результате проведенного исследования можно расположить катионы металлов в зависимости от вязкости гелей в следующий ряд (в порядке возрастания): $\text{Na}^+ \rightarrow \text{Mg}^{2+} \rightarrow \text{Mn}^{2+} \rightarrow \text{Ni}^{2+} \rightarrow \text{Co}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$.

Для исследования влияния анионов были выбраны для сравнения электролиты с одинаковым катионом: NaCl , NaF , NaBr и NaI . В результате проведены исследования особенностей образования супрамолекулярных гидрогелей на основе ЦСР и галогенид-анионов. Ионы йода, брома и хлора в результате взаимодействия с ЦСР приводили к осаждению: I^- - и Br^- -анионы

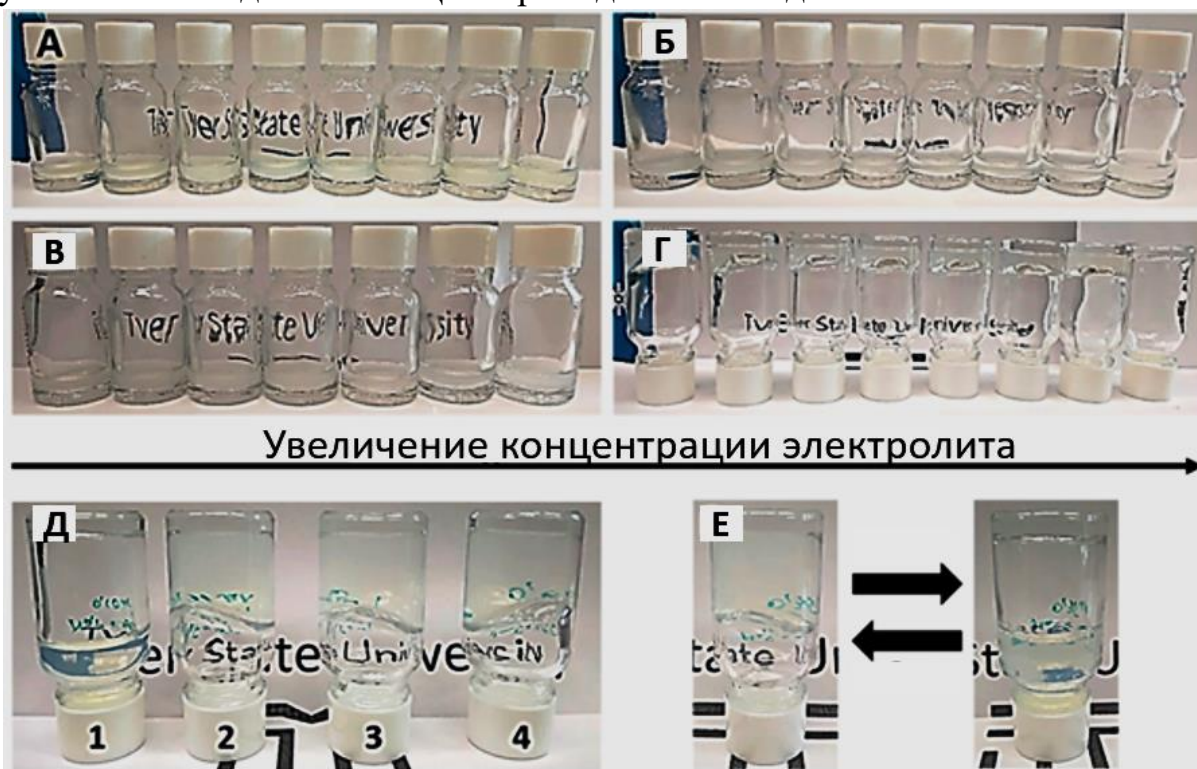


Рис.3.15. Взаимодействие ЦСР с галогенид-анионами: NaI (а), NaBr (б), NaCl (в) и NaF (г) в концентрационном диапазоне 0,2-2,6 мМ (а-в) и 2,8-4,4 мМ (г); гидрогель ЦСР+ NaF с концентрацией аниона 1- 0,9; 2- 3,1; 3- 3,5; 4- 3,9 мМ; проявление тиксотропных свойств гидрогеля с F^- -анионом [193].

образовывали белый или желто-белый осадок различной интенсивности через 2-3 дня без перехода в гидрогель, а в гидрогеле с Cl^- -анионом после перехода в гелеобразное состояние осадок выпадал спустя 1 неделю (рис.3.15. а-в). Сразу после смешивания ЦСР с соответствующим электролитом видимых изменений в системе (выпадения осадка, изменения цвета) не наблюдалось. После выдерживания в темноте в течение суток системы, содержащие галогенид-ионы (за исключением фторид-иона), начали опалесцировать [206]. При добавлении кислородсодержащих галогенидов также изменений не наблюдалось, за исключением системы с анионом иодата, где было зафиксировано незначительное изменение цвета. Последующее воздействие видимого света в течение часа привело к постепенному усилению окраски только в образце, содержащем анион иодата, а в остальных образцах с галогенид-ионами существенных изменений окраски не наблюдалось. При этом впервые было показано, что фторид-анионы способны инициировать процесс «золь-гель-перехода» в ЦСР (рис. 3.15. г). Полученные гели обладают тиксотропными свойствами (рис.3.15. е) и отличаются высокой стабильностью (более 6 месяцев).

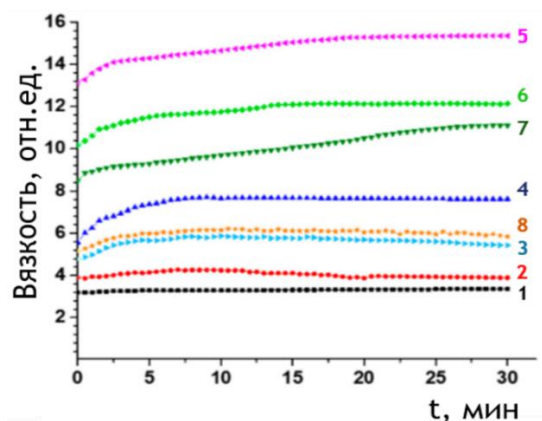


Рис.3.16. Изменение динамической вязкости гидрогелей на основе водного раствора ЦСР ($C=1,0$ мМ) и KF в разных концентрациях: 1- 0,0; 2- 0,9; 3- 1,7; 4- 2,6; 5- 3,1; 6- 3,5; 7- 3,9; 8- 4,6 мМ [193]

Вязкость гелей снижается по мере увеличения концентрации анионов, что обусловлено изменением микроструктуры геля-сетки: переходом от вытянутых структурных элементов к сферическим частицам (рис.3.16) [193]. Так, на рис.3.16 хорошо видно, что до определенной концентрации (3,5 мМ) вязкость гидрогеля увеличивается до значения $\sim 15,0$ отн.ед., а затем при дальнейшем увеличении концентрации, начинает уменьшаться до значения $\sim 5,4$ отн.ед. (кривая 5, $C=3,1$ мМ). В ходе проведенных реологических исследований выбраны 4 концентрации для электролита NaF (рис.3.15 д), в которых в дальнейшем проводили исследования

данного гидрогеля. В результате визуальные наблюдения полностью подтвердились данными вибрационной вискозиметрии, а также что галогенид-ионы склонны к прочному связыванию с супрамолекулярными цепями ЦСР. Нуклеофильность возрастает при движении вниз по периодической таблице ($F^- < Cl^- < Br^- < I^-$) в полярных протонных растворителях; иными словами, F^- является наиболее «мягким» анионом при взаимодействии с супрамолекулярными цепями в ЦСР.

3.2.3. Исследование процесса гелеобразования в гидрогелях методом УФ-спектроскопии

О влиянии аниона электролита на прочностные характеристики геля можно косвенно судить по характеру изменения интенсивности УФ полос поглощения при 310 и 390 нм. Установлено, что при добавлении хлорида металла интенсивность полос уменьшается в ходе гелеобразования, в то время как с сульфатом металла интенсивность полос снижается незначительно (рис.3.17 а, б). Снижение интенсивности указанных полос поглощения свидетельствует о

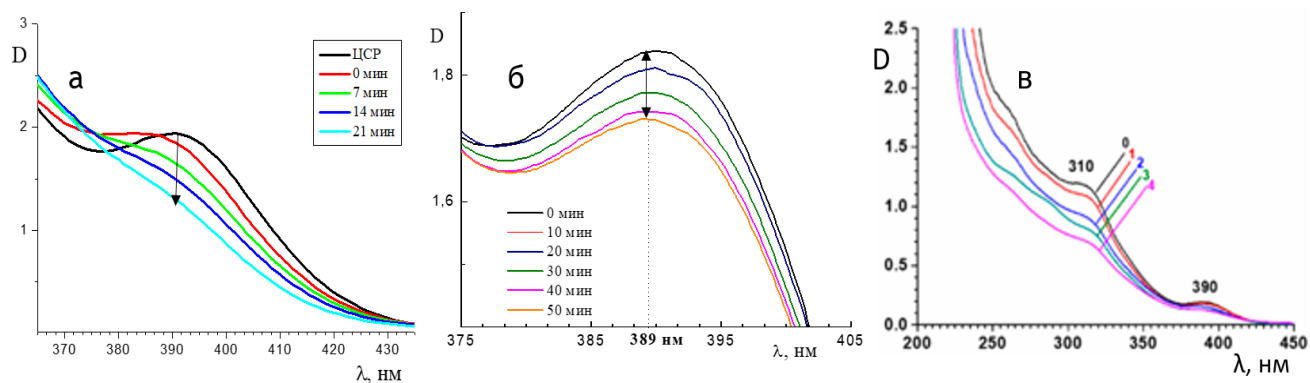


Рис. 3.17. Изменение интенсивности УФ полосы поглощения 390 нм в зависимости от времени гелеобразования: а – ЦСР с NaCl, б – ЦСР с Na₂SO₄, в – ЦСР с NaF (в концентрации: 1-0,9; 2- 2,6; 3-3,1; 4- 3,9 мМ); толщина кюветы d=1 см (а,б) и d=0,1 см (в) [191]

разрушении супрамолекулярных цепей в ЦСР и при их полном распаде процесс гелеобразования не возможен. При добавлении сульфат-аниона происходит небольшое уменьшение значения оптической плотности с 2 до 1,7. Как видно из рис.3.17б на характер изменения полос поглощения не влияет катион металла

электролита. Однако, УФ спектры, характеризующие гелеобразование с сульфат-анионом, существенно отличаются от УФ спектров гидрогелей с хлоридами тех же металлов. Это говорит о том, что сульфат-анионы не вносят дополнительного разрушения в связи тиольной группы в меркаптиде серебра, как это происходит при взаимодействии с хлорид-анионом. Кроме того, существенного различия влияния катионов сульфатов металлов на изменение интенсивности полосы поглощения 390 нм между собой не наблюдается ($\sim 1,7-1,75$) [191,207].

Также установлено, что введение фторид-ионов в ЦСР не изменяет положение полос поглощения при 310 и 390 нм (рис.3.17 в), соответствующих аргентофильным взаимодействиям в комплексах L-цистеин/ Ag^+ . Это свидетельствует о том, что фторид-ионы не влияют на электронную структуру комплексов, а взаимодействуют только с их поверхностью.

3.2.4. Изучение влияния катионов металлов на химическое строение получаемых гидрогелей методом ИК-спектроскопии

Для исследования влияния аниона электролита на процесс структурирования в ЦСР использовали сульфат и хлорид натрия. Методом ИК спектроскопии установлено смещение полос в области деформационных колебаний при взаимодействии SO_4^{2-} и Cl^- с ЦСР. Так, на рис. 3.18 представлено изменение в области $1100-1080 \text{ см}^{-1}$ и образование одной большой полосы, относящейся к деформационным колебаниям $\delta(\text{NH}_3^+)$ [208]. В гидрогелях, вероятно, это объясняется тем, что в ЦСР нитрат- и карбокси-анионы прочно связаны с ионом NH_3^+ остатка цистеина, однако при введении в систему хлорид-анионов последние вытесняют ионы NO_3^- и разрывают связь между NH_3^+ и COO^- . В этом случае кластеры супрамолекулярных цепей меркаптида серебра связываются в структуре ЦСР через ионы NH_3^+ , образуя пространственную гель-сетку, а сульфат-анионы оказывают еще большее воздействие на этот процесс, чем хлорид-анионы. Образование полосы в области 711 см^{-1} , также, как и в спектре с хлорид-анионом, свидетельствует о влиянии именно катиона металла на процесс структурирования

гель-сетки. Кроме того, появление полос для хлорид-аниона в области 770 и 910 см^{-1} , и отсутствие их в спектре гидрогеля с сульфат-анионом, говорит о разной природе взаимодействия Cl^- и SO_4^{2-} аниона на процесс структурирования в ходе гелеобразования, так как здесь проявляются полосы ножничных колебаний $\delta(\text{COOH})$ для ЦСР [191,208].

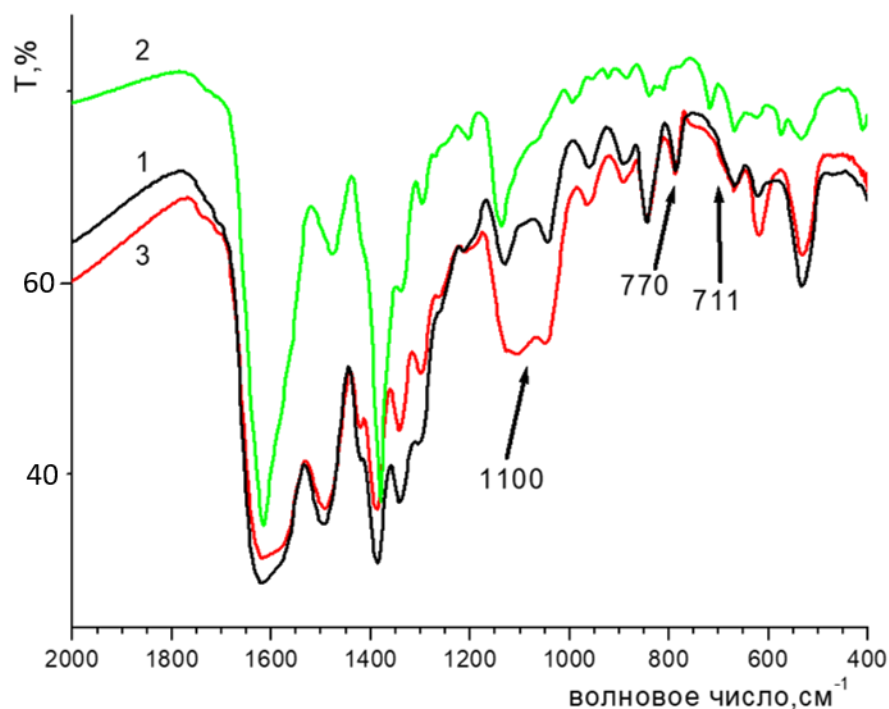


Рис.3.18. ИК спектры пропускания высушенного ЦСР (1) и гидрогелей, полученных добавлением NaCl (2) и Na_2SO_4 (3) [191]

Для сравнения влияния катионов металлов на структуру гидрогеля использовали соли металлов с одинаковым анионом. Так, на рис.3.19 представлены ИК спектры хлоридов натрия, меди и алюминия для сравнения влияния заряда вводимого катиона. Прежде всего стоит заметить, что в спектрах сохраняется меркапид серебра, о чем свидетельствует наличие полосы 2600-2550 см^{-1} , характерной для колебания меркаптанов, а также сохраняется связь $\text{S}-\text{CH}_2$ (пик 2) в области валентных колебаний 2700-2630 см^{-1} и деформационных – в области ~ 1420 см^{-1} , что подтверждает наличие данной связи. При введении данных электролитов ЦСР в спектрах всех образцов наблюдается появление интенсивной полосы при 1710 см^{-1} в спектре гидрогеля с CuCl_2 , относящейся к валентным колебаниям депротонированной карбоксильной группы $\nu_{\text{as}}(\text{COOH})$, а также

небольшого плеча при 1750 см^{-1} , соответствующего валентным колебаниям протонированной карбоксильной группы $\nu_{\text{as}}(\text{COOH})$ [148]. Это обусловлено тем, что при формировании комплекса катионы меди координируют вокруг себя кластеры супрамолекулярных цепей меркаптида серебра (в составе ЦСР), преимущественно через депротонированную карбоксильную группу. В результате

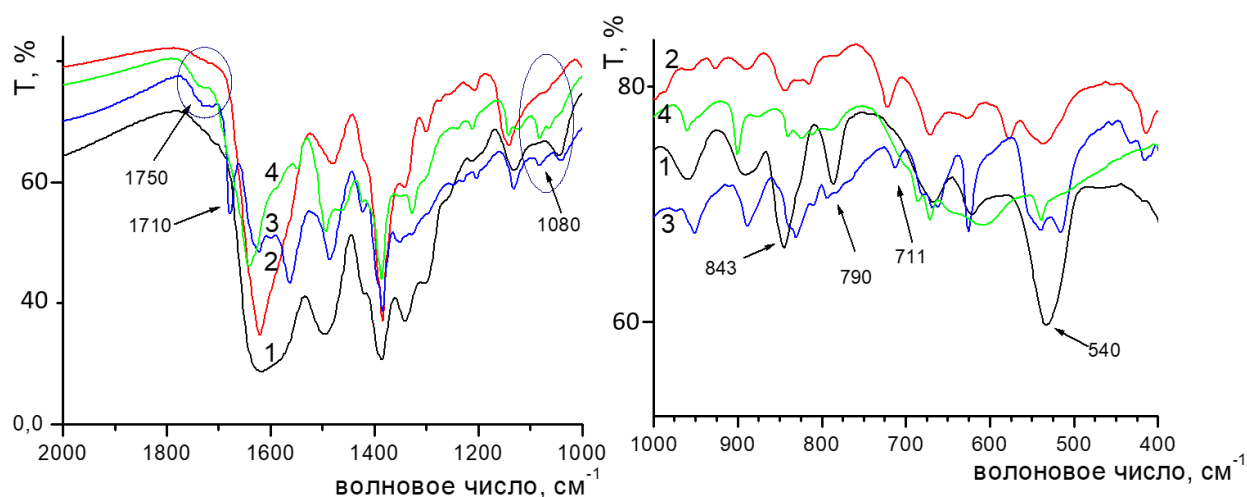


Рис. 3.19. ИК спектры пропускания высушенного с KBr ЦСР (1) и гидрогелей с NaCl (2), CuCl_2 (3) и AlCl_3 (4) [148]

электронная плотность смещается в сторону катиона меди. Появление в спектрах гидрогелей полосы при $1100\text{--}1080\text{ см}^{-1}$ (относящейся к деформационным колебаниям $\delta(\text{NH}_3^+)$) — слабо выраженной для гидрогеля с NaCl и более интенсивной для гидрогелей с AlCl_3 и CuCl_2 — что подтверждает предположение о том, что хлорид-анионы вытесняют ионы NO_3^- и разрывают связь между NH_3^+ и COO^- [148]. Полоса деформационных колебаний $\delta(\text{COOH})$ («ножничные») при 785 см^{-1} в случае ЦСР смещается в длинноволновую область с одновременным снижением интенсивности; также уменьшается интенсивность полосы маятниковых колебаний $\delta(\text{COOH})$ в области $540\text{--}525\text{ см}^{-1}$. Вероятно, эти эффекты объясняются взаимодействием катионов металлов с карбоксильной группой меркаптида серебра в ЦСР, а также участием этих групп в формировании пространственной сетки геля. Кроме того, изменение интенсивности рассматриваемых полос может быть обусловлено зарядом катиона металла и

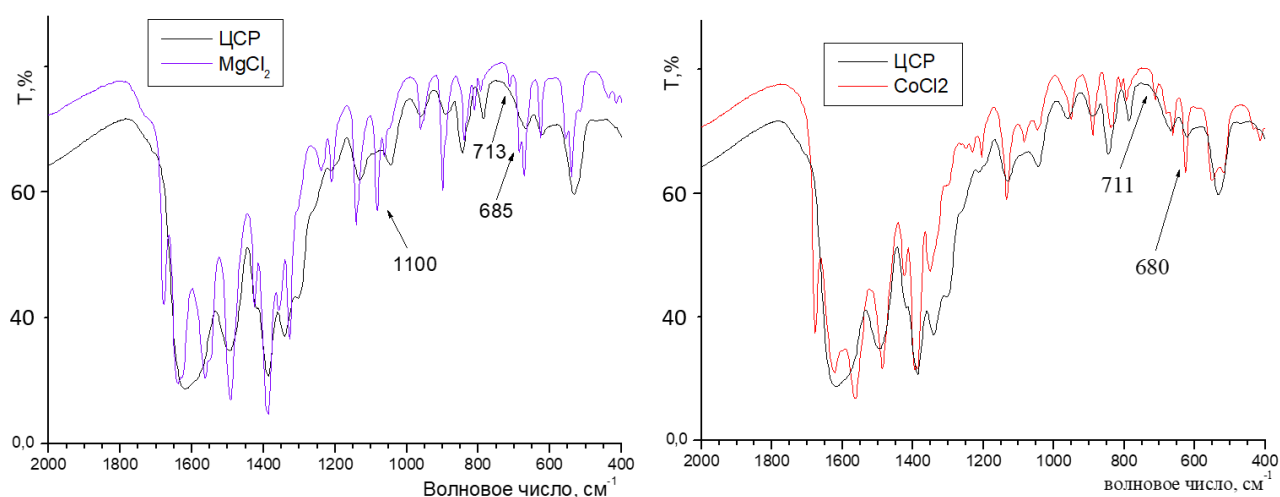


Рис.3.20. ИК спектры пропускания высушенного ЦСП и гидрогелей с MgCl_2 и CoCl_2

прочностью образуемого им комплекса [148].

Данные, полученные методом ИК спектроскопии, показывают, что подобные смещения практически идентичны и характерны для всех гидрогелей с хлорид-анионами, о чем свидетельствует полоса деформационных колебаний на длине волны 800-700 и 650 см^{-1} , что соответствует колебаниям связи $\delta(\text{C-Cl})$. Очевидно наличие характеристической полосы для связи C-NH_2 , входящей в состав аминокислоты L-цистеин, в области 3500 см^{-1} и 1640-1560 см^{-1} (характерна для ножничных колебаний, сильной интенсивности). Из чего можно судить, что данная функциональная группа сохраняется и после разрушения гидрогеля.

3.2.5. Определение размеров и дзета-потенциала частиц, образующихся в результате структурирования в гидрогелях, методом динамического светорассеяния

Установлено, что оптимальный размер частиц (гидродинамический диаметр) для созревшего ЦСП приблизительно равен $\sim 75\text{-}100$ нм (рис.3.9). При добавлении в ЦСП электролита происходит значительное увеличение размеров частиц. На рис. 3.21 представлены результаты изменения размеров частиц в ходе процесса гелеобразования для гидрогелей, образованных одно-, двух- и трехзарядными металлами. Концентрации электролитов соответствуют значению концентрации

вязкого гидрогеля, оцененного по шкале прочности в «5» баллов: для гидрогеля с NaCl – 3,0 мМ, CuCl₂ – 1,5 мМ, AlCl₃ – 3,5 мМ.

Метод динамического светорассеяния (ДСР) был использован для определения гидродинамических диаметров агрегатов, образовавшихся в системах

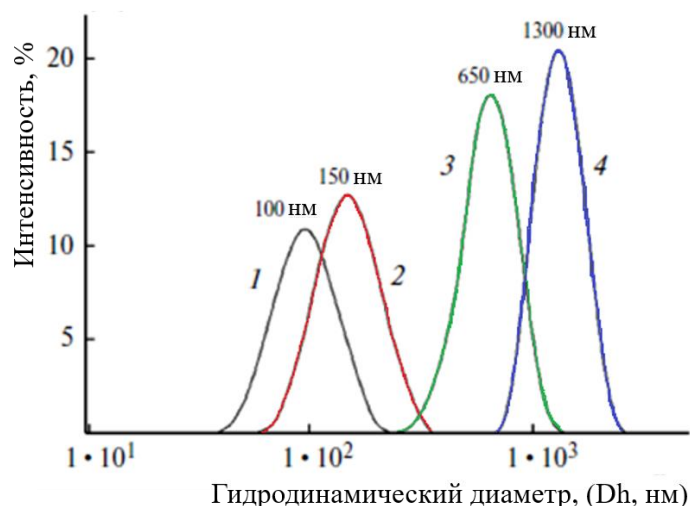


Рис. 3.21. Распределение рассеивающих частиц по размерам (Dh) для ЦСР (1) и для механически разрушенных гидрогелей ЦСР/NaCl (2), ЦСР/AlCl₃ (3), ЦСР/CuCl₂ (4) [148].

ЦСР и механически разрушенных гидрогелях (рис. 3.21). Видно, что для всех рассмотренных систем распределение частиц по размерам является мономодальным. Размеры частиц в системе с NaCl близки к размерам исходных агрегатов ЦСР (100 нм). При переходе к системам с AlCl₃ и CuCl₂ размеры агрегатов существенно возрастают: до 650 и 1300 нм соответственно. Также следует отметить, что при переходе от ЦСР к гелям

коэффициент полидисперсности постепенно уменьшается в ряду: «ЦСР, NaCl, AlCl₃, CuCl₂»: «0,234; 0,212; 0,171; 0,154» соответственно [148].

Увеличение размера частиц в процессе гелеобразования напрямую зависит от заряда вносимого катиона металла и силы комплексообразования. В процессе гелеобразования с двухзарядными сульфат-анионами также происходит быстрое увеличение размеров частиц (рис.3.22), что обусловлено образованием соответствующих комплексов с

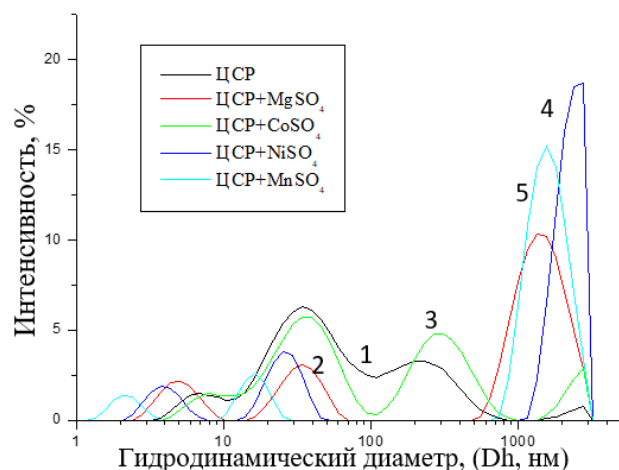


Рис. 3.22. Распределение рассеивающих частиц по размерам (Dh) для ЦСР (1) и для механически разрушенных гидрогелей ЦСР/MgSO₄ (2), ЦСР/CoSO₄ (3), ЦСР/NiSO₄ (4), ЦСР/MnSO₄ (5)

данными катионами. Так, размеры частиц для Na_2SO_4 составляют 210 нм, $\text{CuSO}_4 \sim 1800$ нм, для $\text{MnSO}_4 \sim 1500$ нм, для $\text{NiSO}_4 \sim 1700$ нм, для $\text{CoSO}_4 \sim 1400$ нм, для $\text{MgSO}_4 \sim 570$ нм. При сравнении результатов, полученных для гидрогелей с SO_4^{2-} -

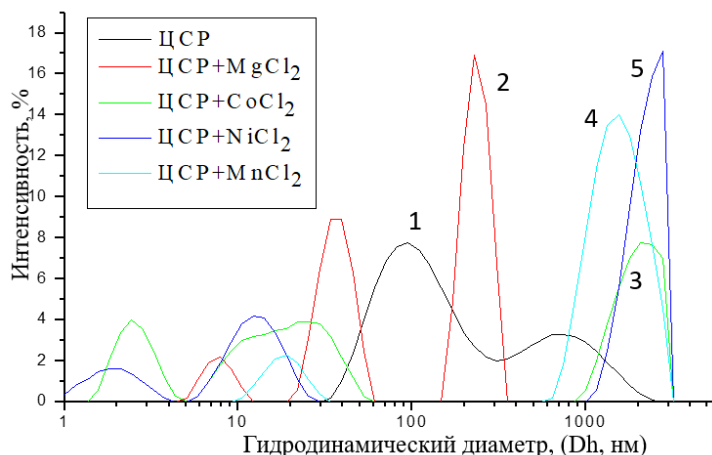


Рис. 3.23. Распределение рассеивающих частиц по размерам (Dh) для ЦСР (1) и для механически разрушенных гидрогелей ЦСР/ MgCl_2 (2), ЦСР/ CoCl_2 (3), ЦСР/ NiCl_2 (4), MnCl_2 (5)

Данные метода ДСР подтвердили постепенный рост агрегатов в ходе процесса гелеобразования (рис. 3.24), исследование проводили до момента образования вязкого гидрогеля для 4-х выбранных концентраций фторид-аниона. Данные метода динамического светорассеяния указывают на мономодальное

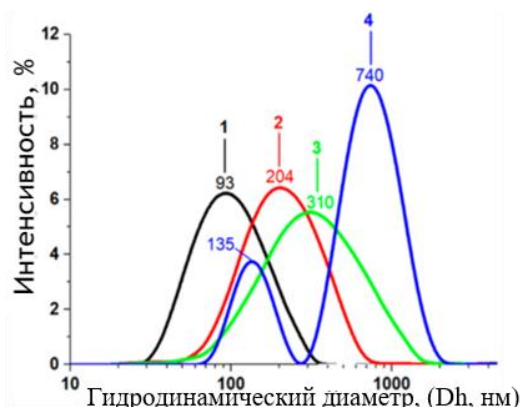


Рис. 3.24. Распределение рассеивающих частиц по размерам гидродинамического диаметра в концентрациях: 0,9 (1); 2,6 (2); 3,1 (3); 3,9 мМ (4).

анионом и Cl^- -анионом (рис.3.23), установлено, что для гидрогелей с сульфат анионом характерны немного большие размеры образующихся частиц, чем для гидрогелей, образованных хлоридами тех же металлов. Это свидетельствует о том, что в процессе структурирования кроме катиона существенное влияние оказывает также и анион электролита.

распределение частиц по размерам (рис. 3.24). Увеличение содержания фторид-анионов в системе приводит к росту размера частиц и снижению коэффициента полидисперсности, при этом распределение становится бимодальным. Гидродинамический диаметр частиц ЦСР составляет 50 нм.

Для определения заряда на поверхности образующихся в ходе гелеобразования частиц использовали метод динамического светорассеяния. В результате установлено,

что значение дзета-потенциала рассеивающих частиц исходного ЦСР составляет +60 мВ. Это значение определяется преимущественно полностью протонированными аминогруппами, что согласуется с изоэлектрической точкой (pI) системы [209]. При введении электролитов в ЦСР

Таблица 4.

Измерение дзета-потенциала ЦСР в разных разбавлениях и гидрогелей с NaCl, CuCl₂ и AlCl₃

№	Образец	Дзета-потенциал, mV
1	ЦСР	+60,0
2	ЦСР+NaCl	+40,1
3	ЦСР+AlCl ₃	+48,2
4	ЦСР+CuCl ₂	+54,2

значение дзета-потенциала падает: +40, +48, +54 мВ для NaCl, AlCl₃ и CuCl₂, соответственно (табл.4). Для гидрогеля с KF с увеличением концентрации от 0,9 до 3,9 значение дзета-потенциала падает: от +48,6 до +36,6 мВ соответственно, что связано с особенностью построения гель-сетки с F⁻-анионом. Результаты измерений дзета-потенциала гидрогелей с фторид-анионом представлены на рис.

3.25. Наблюдается закономерное снижение значений дзета-потенциала по мере увеличения концентрации фторид-анионов. Кроме того, повышение содержания анионов в системе сопровождается появлением второго пика в области нулевого значения дзета-потенциала.

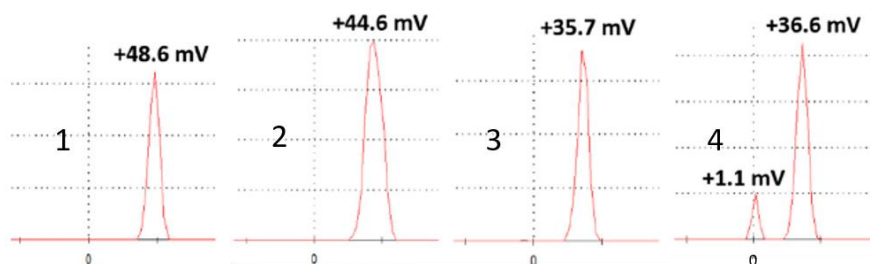


Рис. 3.25. Дзета-потенциал гидрогелей с F⁻-анионом в концентрациях: 1- 0,9; 2- 2,6; 3- 3,1; 4- 3,9 мМ [193].

3.2.6. Исследование изменения электропроводности в процессе гелеобразования в системах с разными катионами металлов методом кондуктометрии

Доказательством встраивания катиона в структуру гель-сетки могут служить данные об уменьшении электропроводности в ходе процесса гелеобразования (рис. 3.26). Величина электропроводности в водной системе зависит от числа свободных ионов, их валентности и подвижности, и при формировании пространственной гель-сетки, в которой участвуют ионы, снижается. Установлено, что значение удельной электропроводности «созревшего» ЦСР составляет 551 $\mu\text{См/см}$ (рис. 3.8). После введения в ЦСР электролита в начале происходит увеличение значения удельной электропроводности, т.к. вклад в повышение значения вносят ионы электролита. При введении электролита в ЦСР происходит уменьшение значения удельной электропроводности до перехода в стабильное значение. Падение значения удельной электропроводности при введении электролита в ЦСР может указывать на уменьшение числа подвижных ионов электролита при встраивании катионов и анионов в структуру образующейся гель-сетки. Для гидрогелей с CuCl_2 (рис. 3.26 а) и NaCl (рис. 3.26 б) тенденция снижения удельной электропроводности с ростом введенного электролита сходна, с

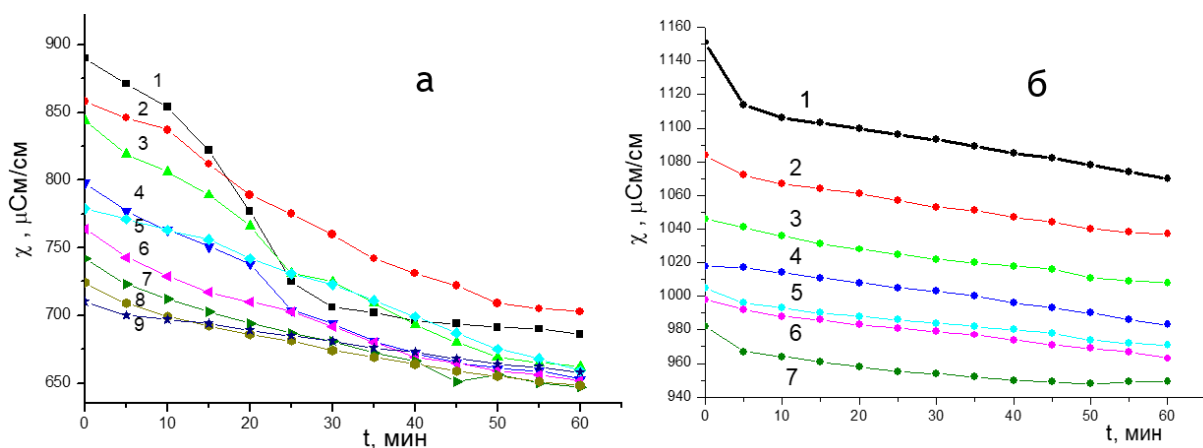


Рис. 3.26. Изменение удельной электропроводности в созревшем ЦСР ($C=1,00$ мМ) во времени при комн. темп. с CuCl_2 (а) ($C_{\text{эл}}$: 0,20 (1), 0,29 (2), 0,38 (3), 0,48 (4), 0,56 (5), 0,65 (6), 0,74 (7), 0,83 (8) и 0,91 (9) мМ) и NaCl (б) ($C_{\text{эл}}$: 0,50 (1), 1,00 (2), 1,50 (3), 2,00 (4), 2,50 (5), 2,80 (6) и 3,10 (7) мМ)

небольшими нюансами. Следует отметить, что значение электропроводности в ЦСР с ионами NaCl выше, чем с CuCl₂, что объясняется более высокой подвижностью катиона Na⁺, а также большей силой комплексообразования катиона Cu²⁺. Электролиты вносили по частям в разных концентрациях в соответствии с полученными данными гистограмм концентрационных диапазонов (рис.3.11). Установлено, что процесс гелеобразования с NaCl сопровождается «ступенчатым» уменьшением электропроводности, в то время как с CuCl₂ спустя 10 минут происходит резкое уменьшение электропроводности до перехода в стабильное значение (плато). Начиная с концентрации 0,74 мМ в гидрогеле, в течение 60 мин. значения электропроводности мало изменяются (~748-650 мСм/см), что свидетельствует о затруднении свободного перемещения ионов электролита, а, следовательно, об образовании вязкого гидрогеля. Для гидрогеля с NaCl значение удельной электропроводности при образовании вязкого гидрогеля соответствует 955 мСм/см.

Таким образом, установлено, что при добавлении небольших концентраций электролита в системе образуется пространственная гель-сетка, так как супрамолекулярные цепи из молекул меркаптида серебра связываются между собой диссоциированными ионами электролита. Это ведет к существенному снижению электропроводности. Однако, гидрогель обладает свойствами тиксотропии, и при механическом перемешивании системы гель-сетка частично разрушается, а ионы высвобождаются. Дальнейшее увеличение концентрации электролита приводит к увеличению значения электропроводности в начальный момент времени (0-5 мин), однако, с каждым последующим введением электролита, несмотря на то, что ионов становится больше, значение электропроводности продолжает уменьшаться, что связано с формированием более прочной пространственной гель-сетки.

Полученные данные об изменении прочности, вязкости и электропроводности гелей хорошо коррелируют между собой и подтверждают общую теорию механизма встраивания катиона и аниона вводимых в ЦСР электролитов в процессе образования пространственной гель-сетки.

3.2.7. Определение зависимости изменения показателя кислотности в ходе координирования катионов металлов в структуре гидрогеля методом рН-метрии

С помощью метода рН-метрии удалось установить изменение кислотности в ходе процесса гелеобразования с разными электролитами. Так, на рис. 3.27

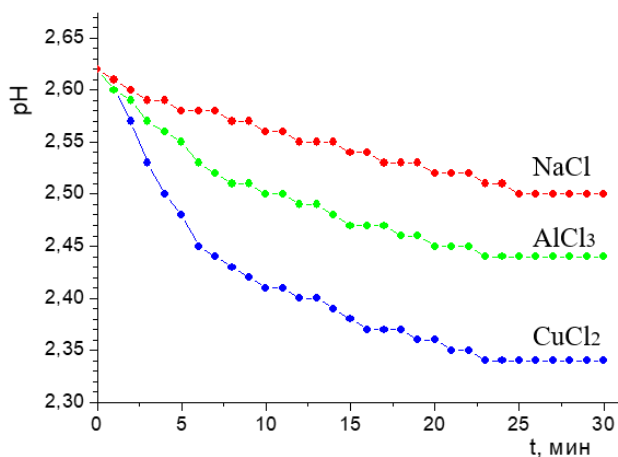


Рис. 3.27. Кинетика изменения величины кислотности (рН) в процессе гелеобразования при добавлении к ЦСР хлоридов Na^+ , Cu^{2+} , Al^{3+}

представлены кинетические зависимости изменения кислотности гидрогелей, образованных одно-, двух- и трехзарядными катионами металлов. Ранее было установлено, что значения рН для ЦСР составляет 2,62. При добавлении электролита в ЦСР происходит увеличение кислотности раствора. По полученным результатам можно выявить закономерность по

увеличению кислотности в системе: ЦСР – NaCl – AlCl_3 – CuCl_2 . Можно заметить, что наибольшее увеличение кислотности в гидрогеле происходит при добавлении в ЦСР хлорида меди. Это связано с тем, что в процессе гелеобразования Cu^{2+} , являясь более сильным комплексообразующим катионом, по сравнению с Na^+ и Al^{3+} , взаимодействует с большим количеством карбоксильных групп в ЦСР, тем самым высвобождая больше ионов H^+ , что также подтверждается данными ИК спектроскопии (рис. 3.19). Так, при введении в ЦСР электролитов, на спектрах всех образцов происходило уменьшение интенсивности и смещение положения полос поглощения, отвечающих карбоксильным и аминогруппам L-цистеина, что может быть связано с вовлечением данных группировок в формирование пространственной сетки геля.

3.2.8. Изучение морфологии получаемых гидрогелей методами просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии (с элементным анализом)

Анализ микрофотографий ЦСР и гидрогелей с хлоридом и сульфатом металла, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (рис. 3.28), показывает, что ЦСР имеет пятнистую структуру. Темные пятна

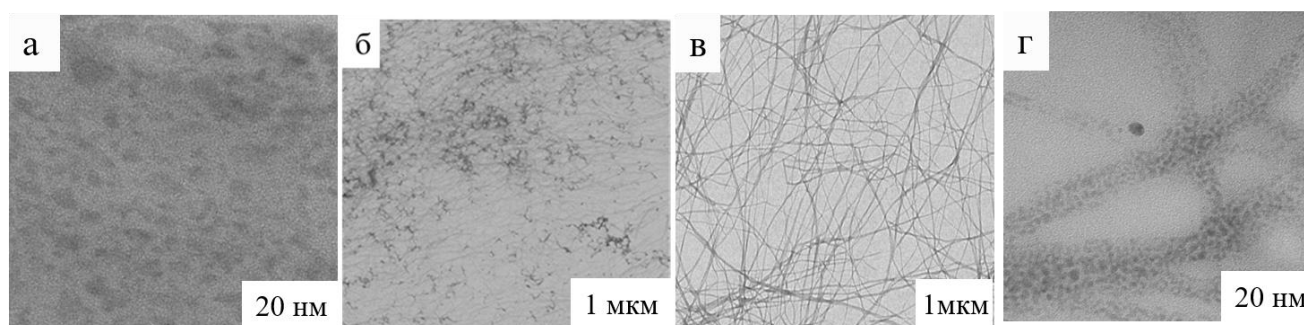


Рис. 3.28. ПЭМ-снимки ЦСР (а) и гидрогелей ЦСР/NaCl (б) и ЦСР/Na₂SO₄ (в, г) [191].

отвечают кластерам, состоящим из супрамолекулярных цепей МС (рис. 3.28 а). Видно, что ЦСР представляет собой систему с рыхлой структурой, но при добавлении в ЦСР сульфата металла (рис. 3.28 б) происходит агломерация и образование пространственной гель-сетки, в результате встраивания сульфата металла в структуру в ходе процесса гелеобразования. Данные микрофотографии (рис. 3.28 б-г) соответствуют состоянию вязкого гидрогеля, оцененного в «5» баллов по пятибалльной шкале [191]. Гидрогели с хлоридом натрия характеризуются сеточной структурой с встроенными в сетку темными гранулами, включающими в себя катионы натрия (рис. 3.28 б). Гидрогель с сульфатом натрия имеет однородную сеточную структуру (рис. 3.28 в,г) типа «конского волоса» (рис. 3.28 в) при слабом разрешении.

О наличии и свойствах пространственной гель-сетки также можно судить по данным сканирующей электронной микроскопии. Так, из представленных на рис. 3.29 снимков видно, что в ЦСР (рис. 3.29 а) характерна ровная, однородная поверхность, без включений, в то время как для гидрогеля с NaCl (рис. 3.29 б) свойственна рыхлая более-менее однородная поверхность с небольшим

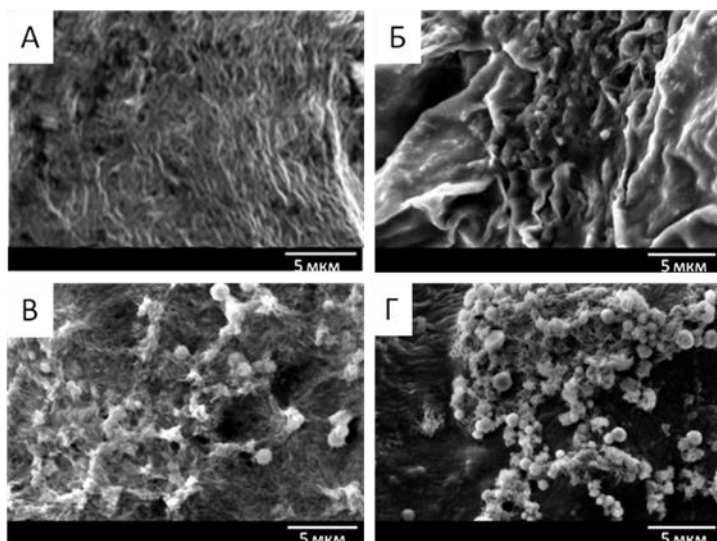


Рис. 3.29. СЭМ-снимки ЦСР (а) и различных гелей на основе ЦСР: ЦСР/NaCl (б), ЦСР/AlCl₃ (в), ЦСР/CuCl₂ (г) [148].

количеством гранул (глобул). В то же время для гидрогеля с CuCl₂ (рис. 3.29 г) наблюдается большое количество гранул, связанных между собой, что может свидетельствовать о высокой способности катионов Cu²⁺ к комплексообразованию, по сравнению с Na⁺. Анализ микрофотографий гидрогеля с AlCl₃ (рис. 3.29 в) показывает, что в нем меньше связанных гранул,

чем в гидрогеле с хлоридом меди. Экспериментальные данные, полученные методом СЭМ, хорошо согласуются с результатами, полученными методами оценки прочности гелей по 5-балльной шкале и вискозиметрическими исследованиями.

Таким образом, установлено, что механические свойства гидрогелей обусловлены особенностями микроструктуры пространственной гель-сетки, на структуру которой оказывает влияние не только катионы, но и анионы электролита. Для исследования этого эффекта были выбраны электролиты с одноименным катионом (Na⁺) и разными анионами (рис. 3.30). Действительно, при сравнении структуры гель-сетки, образованной хлоридом натрия (рис. 3.30 а) и сульфатом натрия (рис. 3.30 б), можно заметить, что гель-сетка, образованная Cl⁻-анионами имеет рыхлую структуру с включениями из отдельных сферических агрегатов; гель-сетка с SO₄²⁻-анионами представляет собой однородную складчатую структуру, что связано с проявлением более вязких и прочностных свойств гидрогелей, образованных SO₄²⁻-анионами, по сравнению с Cl⁻-анионами.

Гель-сетка, образованная фторид-анионами, выглядит иначе. Повышение концентрации фторид-ионов приводит к морфологическим изменениям каркаса гидрогеля (рис. 3.30 в-д) [193]: элементы каркаса уменьшают свою удельную

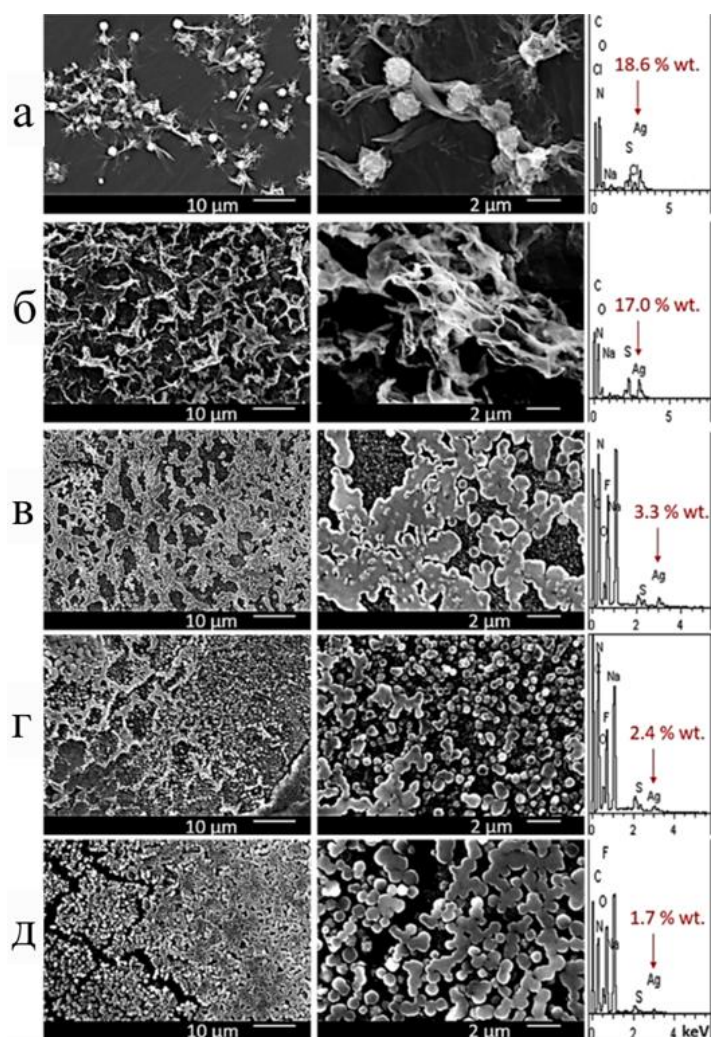


Рис. 3.30. СЭМ-снимки и данные элементного анализа для различных гелей: а-ЦСП/NaCl, б-ЦСП/Na₂SO₄, в-д-ЦСП/KF в концентрации: 3,1 (в), 3,5 (г) и 3,9 (д) mM.

поверхность, переходя от вытянутых структур (как на рис. 3.30 в) к сферическим частицам (элементарным зернам) диаметром от 0,1 до 2 мкм (рис. 3.30 г-д). Для исследования были взяты три концентрации электролита NaF: 3,1, 3,5 и 3,9 mM. Полученные результаты объясняют данные вискозиметрии для тех же концентраций, где максимальная вязкость соответствовала концентрации 3,1 mM, а при дальнейшем увеличении концентрации (3,-3,9 mM) уменьшалась. Также следует отметить, что после нескольких циклов механического разрушения гелей восстанавливались только те, в которых содержание фторид-

ионов было минимальным. В качестве систем для сравнения представлены гидрогели на основе анионов Cl⁻ и SO₄²⁻ (рис. 3.30 а,б): гель на основе хлорид-аниона при многократном механическом воздействии быстро разрушается. Что, скорее всего, связано с тем, что, как было упомянуто выше, его гель-сетка имеет рыхлую структуру, построенную из отдельных сферических агрегатов. Гидрогель на основе сульфат-аниона демонстрирует довольно плотную структуру, состоящую из пересекающихся лентообразных волокон, что придает структуре некоторую устойчивость к механическим воздействиям. Таким образом, установлено, что механические свойства гидрогелей связаны с особенностями микроструктуры гель-сетки. Отметим, что результаты исследований методом динамического

светорассеяния (ДСР) и электрохимических измерений согласуются с данными вискозиметрии (рис. 3.13 и рис. 3.14) и микрофотографиями, полученными методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис. 3.29). Вероятнее всего, образование более крупных агрегатов в системах с катионами меди и алюминия (по сравнению с системами, содержащими ионы натрия) обусловлено комплексообразующими свойствами этих ионов. Вследствие этого в данных системах наблюдаются более высокие значения вязкости и дзета-потенциала, а также более низкая электропроводность.

Результаты элементного анализа подтвердили данные СЭМ, что при увеличении концентрации фторид-ионов содержание ионов Ag^+ на поверхности гель-сетки снижается.

3.2.9. Предполагаемый механизм структурирования (комплексообразования) в получаемых гидрогелях

Согласно результатам экспериментальных и теоретических исследований частицы (кластеры) в ЦСР имеют сферическую форму, с амино- и карбокси-группами на поверхности, которые отвечают за растворимость частиц и коллоидную стабильность раствора. При введении электролитов в систему прежде всего ионы адсорбируются на поверхности частиц, их положительный заряд уменьшается, радиус экранирования Дебая уменьшается, и частицы начинают сближаться друг с другом. В этом случае вероятно, что катионы достигают поверхности частиц в ЦСР быстрее из-за их более высокой электрофоретической подвижности по сравнению с хлорид-анионами, поскольку $\text{pH} < 3$, это означает, что взаимодействие катиона металла может происходить только с карбоксильной группой аминокислоты. Катион натрия взаимодействует с атомом кислорода карбоксильной группы частиц ЦСР, тогда как катионы алюминия и меди координируются с несколькими молекулами ЦСР через карбоксильную группу в зависимости от силы комплексообразования катиона. Дополнительная стабилизация образующихся частиц может обеспечиваться за счет

электростатических и водородных связей между амино- и карбоксильными группами. Таким образом, предположительно катион Na^+ взаимодействует с одной карбоксильной группой в молекуле МС, катион Al^{3+} - с двумя карбоксильными группами, а катион Cu^{2+} - способен образовать комплекс с 4 карбоксильными группами в ЦСР, что подтверждается данными СЭМ, ИК спектроскопии, дзета-потенциала, ДРС, рН-метрии и др.

Хорошо известно, что ионы меди и алюминия способны образовывать комплексы с алифатическими аминокислотами. При этом ион меди является более сильным комплексообразователем, чем ион алюминия, вследствие своей более высокой поляризуемости. Кроме того, ион Cu^{2+} способен задействовать d-орбитали, тогда как алюминий такой возможностью не обладает. Именно поэтому число супрамолекулярных цепей, способных связываться с ионами Cu^{2+} , превышает число цепей, связывающихся с ионами Al^{3+} ; в результате на кривых динамического светорассеяния (ДСР) и снимках сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) мы фиксируем более крупные кластеры, а также наблюдаем повышенную вязкость растворов и гелей и их пониженную электропроводность.

Также установлено, что в процессе гелеобразования помимо катионов участвуют и анионы вводимого электролита. На основе полученных результатов можно предложить возможный поэтапный механизм самоорганизации (рис. 3.31) при участии анионов электролита:

- 1) На основании данных измерений дзета-потенциала, анализа распределения частиц по размерам и УФ-спектроскопии установлено, что фторид-ионы адсорбируются на положительно заряженной поверхности частиц ЦСР и нейтрализуют их заряд, что приводит к сближению частиц и усилению межчастичного взаимодействия с образованием более крупных агрегатов. При этом процесс перехода «гель–золь» в большинстве случаев связан с разрушением водородных связей между молекулами дисперсной фазы или со специфическим взаимодействием анионов. Кроме того, именно электростатические силы обуславливают обратимость системы, то есть придают ей тиксотропные свойства.

2) При достижении определенного значения заряда частиц система начинает терять коллоидную устойчивость: изотропный золь превращается в структурированную анизотропную систему, формируется пространственный каркас и, наконец, образуется гель.

Взаимодействие L-цистеина с ионами серебра приводит к подкислению среды ($\text{pH} = 2,6$) и образованию внутренней «оболочки», образованной комплексом L-цистеина с ионами Ag^+ . Внешняя сторона «оболочки» сформирована амино- и карбоксильными группами. Изoeлектрическая точка (pI) такой системы составляет 5,5; иными словами, наночастицы обладают положительным поверхностным зарядом, который обеспечивает устойчивость золя, что подтверждается данными дзета-потенциала. Система ведет себя подобно глобулярному белку. Вследствие структурирования системы энтропия уменьшается, а частицы дисперсной фазы

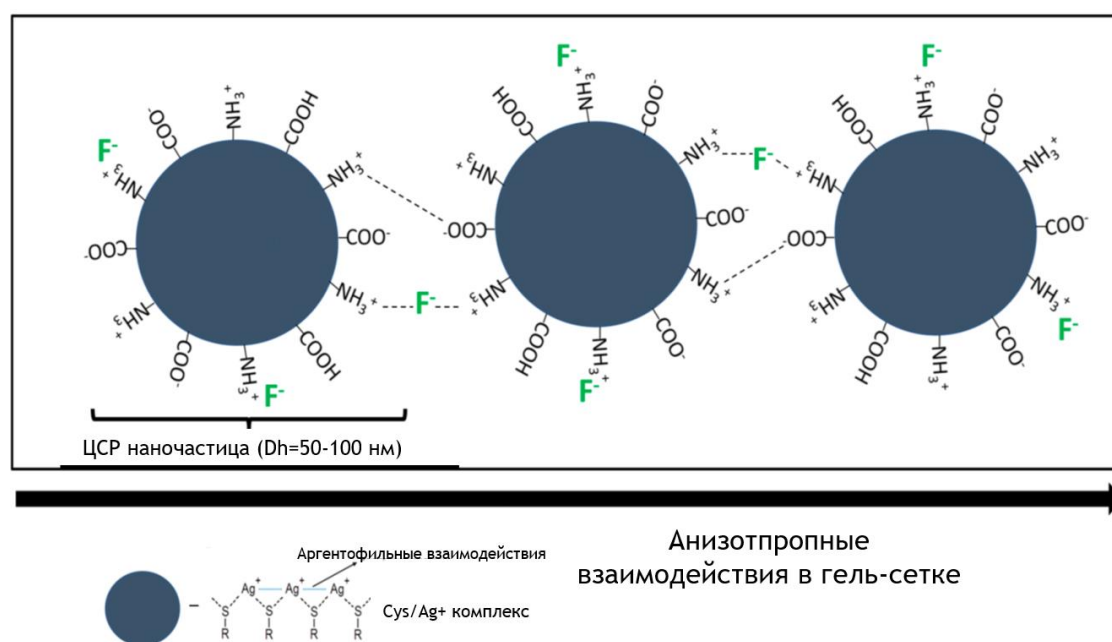


Рис. 3.31. Предлагаемый механизм структурирования аниона с супрамолекулярными цепочками на основе МС в процессе гелеобразования на примере фторид-аниона

образуют вытянутые волокна, которые вступают в более тесный контакт с молекулами дисперсионной среды, что приводит к увеличению энтальпии системы. Такое поведение характерно для всех низкомолекулярных гелеобразователей. Подобную самоорганизацию инициируют сульфат-анионы. Однако в случае ионов F^- при формировании гель-сетки наблюдается anomalous

поведение. Хорошо известно, что ионы фтора образуют с молекулами воды наиболее прочные водородные связи по сравнению с другими анионами, что обусловлено их наименьшим атомным радиусом и максимальной линейной плотностью заряда. Таким образом, ионы F^- способствуют скручиванию вытянутых волокон гелевой сетки в более компактные сферические частицы, поскольку молекулы воды склонны образовывать наибольшее число связей с поверхностью агрегатов ЦСР, что подтверждается данными СЭМ.

В результате проведенных исследований можно предположить общий механизм структурирования в ЦСР при взаимодействии с электролитами (рис.3.32).

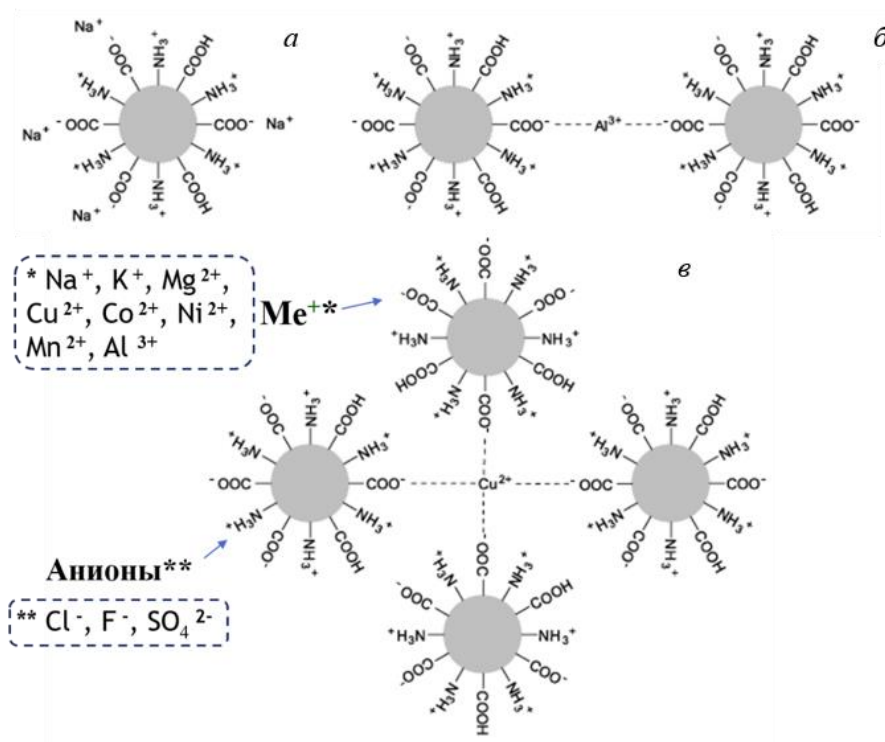


Рис. 3.32. Схема встраивания катионов металла и анионов в пространственную сетку гидрогеля

Механизм самоорганизации в цистеин-серебряных гидрогелях, предложенный на основе практических результатов, полученных в ходе крупного комплексного исследования физико-химическими методами, согласуется и подтверждает теоретические результаты компьютерного моделирования, проведенного ранее группой ученых на модели ЦСР (диссертация Малышева М.Д. «Моделирование сетчатых молекулярных систем различной химической

природы», 2022), где описывается образование «ядра-оболочки» в процессе «созревания» ЦСР (при $T=27^{\circ}\text{C}$) в результате координирования S-Ag, и расположения их внутри оболочки, и диссертационные работы Комарова П.В. «Многомасштабное моделирование нанодисперсных полимерных систем» (2014) и Бабуркина П.О. «Мезомасштабное моделирование процессов самосборки в трехкомпонентных супрамолекулярных наносистемах» (2022), рассматривающие также в моделях компьютерного моделирования участие электролита в процессе гелеобразования в ЦСР.

3.3. Изучение свойств и процесса структурирования глутатиона и нитрата серебра

Установлено, что при добавлении в ЦСР различных низкомолекулярных электролитов запускается процесс гелеобразования, и формируется супрамолекулярный тиксотропный гидрогель. Такие гидрогели вызывают большой интерес благодаря приобретаемым свойствам и могут иметь широкое применение в области медицины и фармацевтики в качестве матрицы-переносчика. В связи с этими исследованиями, был поставлен вопрос о поиске дополнительных видов «матриц» для улучшения фармакокинетических и фармакологических свойств этих систем. Одним из таких веществ, потенциально способных ассоциировать с ионами серебра и образовывать гидрогель, может быть глутатион (рис. 3.33), в состав которого входит аминокислота L-цистеин, участвующая в двухэтапном процессе гелеобразования с солями серебра, аминокислота L-глицин и глутаминовая кислота.

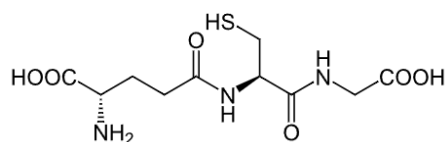


Рис. 3.33. Молекула глутатиона в восстановленной форме (GSH)

Выбор глутатиона обусловлен его положительным влиянием на организм человека: повышает защиту нервных тканей и клеток от оксидативного стресса,

увеличивает восстановительные способности организма. Глутатион является одним из самых мощных антиоксидантов, благодаря чему широко используется в медицинской сфере, спорте и косметологии. Таким образом, разностороннее исследование процессов самоорганизации, структуры и свойств образующихся систем GSH/AgNO₃ является актуальной задачей.

Глутатион использовали исключительно в восстановленной форме, т.к. именно в этой форме в его составе есть не замещенная тиольная группа (рис. 3.33).

Данный трипептид выбран неслучайно, т.к. в его структуру входит, помимо глицина и глутаминовой кислоты, еще и L-цистеин. Исходя из этого, нитрат серебра также способен координироваться через тиольную группу с глутатионом. Таким образом, глутатион может выступить в качестве аналога L-цистеина при исследовании процессов самоорганизации и гелеобразования в водном растворе.

В начале была приготовлена серия растворов GSH/AgNO₃ с концентрациями глутатиона и нитрата серебра 0,01 моль/л в объемных соотношениях глутатиона к нитрату серебра: 1:0.25, 1:0.5, 1:0.75, 1:1, 1:1.25, 1:1.5, 1:1.75, 1:2, 1:2.25. Провели визуальную оценку процесса взаимодействия нитрата серебра с глутатионом в исследуемых соотношениях. На рис. 3.34 представлены результаты визуального исследования по определению оптимального соотношения. В результате установлено, что для данной системы GSH/AgNO₃ оптимальными соотношениями являются – 1:2 и 1:2,25. Соотношение 1:1,75 находится в переходном состоянии, и при смешении исходных веществ становится прозрачным не сразу, а спустя 2 мин. в отличие от соотношений 1:2 и 1:2,25, где раствор становится прозрачным практически сразу после смешения. В остальных соотношениях происходит опалесценция и выпадение белого осадка.

Таким образом, в результате визуального исследования смесей установлено, что для получения стабильной системы необходимо, чтобы нитрат серебра находился как минимум в двукратном избытке относительно глутатиона. В таких соотношениях растворы остаются прозрачными, устойчивыми во времени, и в них

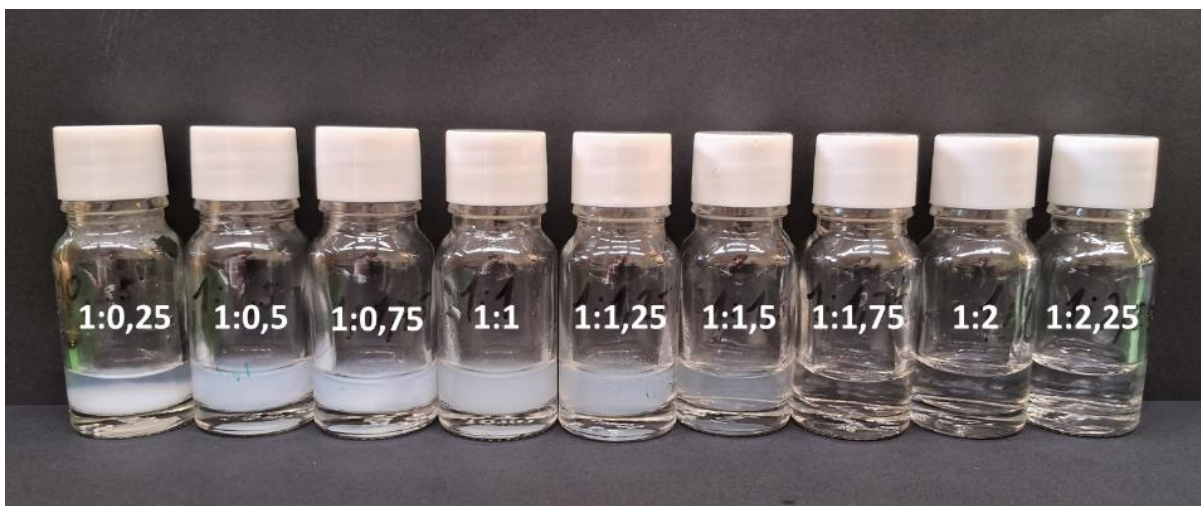


Рис. 3.34. Серия водных растворов глутатион/нитрат серебра (в соотношениях от 1:0,25 до 1:2,25)

не наблюдается выпадения осадка даже по истечению месяца с момента приготовления. Полученные результаты существенно отличаются от известного соотношения L-цистеина к нитрату серебра, в котором оптимальным соотношением Cys/AgNO₃ является 1:1,25–1:1,27. Такую разницу в соотношениях аминокислоты L-цистеина и трипептида глутатиона, в составе которого присутствует L-цистеин, можно объяснить более сложной структурой глутатиона по сравнению с L-цистеином.

В ходе реологических исследований (рис. 3.35) установлено, что вязкость выбранных устойчивых соотношений выше, чем динамическая вязкость образцов с меньшим содержанием нитрата серебра по отношению к глутатиону: $\eta(1:0,25)=0,95$, $\eta(1:1)=0,98$, $\eta(1:2)=1,09$, $\eta(1:2,25)=1,16$. Также, при сравнении вязкости данных систем с вязкостью исходных компонентов, можно заметить, что их значения отличаются: $\eta(\text{GSH})=0,95$, $\eta(\text{AgNO}_3)=0,96$.

Таким образом, результаты вискозиметрического исследования демонстрируют, что в результате взаимодействия нитрата серебра и глутатиона происходят процессы структурирования.

Методом pH-метрии исследовали изменение показателя кислотности в ходе процесса самоорганизации в исследуемых системах. В табл. 5 представлены значения величины pH для исходного водного раствора GSH и смешанных

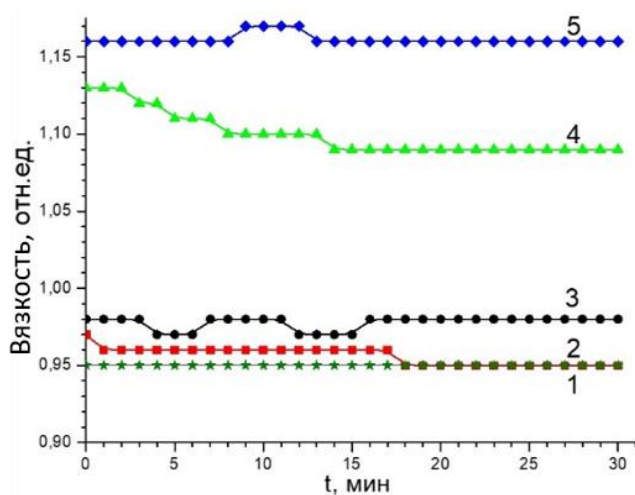


Рис. 3.35. Зависимость изменения вязкости от соотношения в системе GSH/AgNO₃: GSH (1); 1:0,25 (2); 1:1,00 (3); 1:2,00 (4); 1:2,25 (5), C=1,00 мМ

растворах (GSH/AgNO₃) в концентрационных соотношениях от 1,00:0,25 до 1,00:2,25.

Из табл.5 видно, что при добавлении нитрата серебра в водный раствор глутатиона степень кислотности растет от pH=2,91 для глутатиона до pH=2,36 в смешанном растворе при GSH/AgNO₃ = 1,00:2,25, что обусловлено, как и в случае L-цистеина, с взаимодействием ионов серебра с тиольной группой глутатиона, приводящим к

высвобождению протонов водорода и подкислению раствора. При достижении

Таблица 5.

Изменение показателя pH в системах GSH/AgNO₃

Образец	GSH	GSH/AgNO ₃ 1,00:0,25	GSH/AgNO ₃ 1,00:0,50	GSH/AgNO ₃ 1,00:0,75	GSH/AgNO ₃ 1,00:1,00
pH	2,91	2,58	2,56	2,53	2,52
Образец	GSH/AgNO ₃ 1,00:1,25	GSH/AgNO ₃ 1,00:1,50	GSH/AgNO ₃ 1,00:1,75	GSH/AgNO ₃ 1,00:2,00	GSH/AgNO ₃ 1,00:2,25
pH	2,45	2,43	2,41	2,37	2,36

соотношений (1:2,00, 1:2,25 и выше) значение кислотности стабилизируется, и его дальнейшие изменения незначительны и находятся в пределах погрешности, что говорит об оптимизации пространственной структуры глутатиона. Стоит заметить, что при смешении растворов вначале наблюдается помутнение при всех соотношениях, но в течение 30 сек для соотношений 1:2,00 и 1:2,25 растворы становятся прозрачными, и осадок не выпадает. В остальных растворах происходит постепенное выпадение осадка с течением времени (1 мин). После чего данное состояние как на рис. 3.34 сохраняется без изменений длительное время (~месяц).

Только после достижения прозрачности раствора производили измерение его кислотности.

Данные соотношения сохраняли устойчивость в течение минимум 4-х недель, что также подтверждалось методом УФ-спектроскопии. На УФ спектре пропускания (рис. 3.36 а, кривые 1-5) зафиксирован переход от мутного, опалесцирующего раствора в соотношении от 1:0,25 до 1:1,50 к прозрачному раствору в соотношении от 1:2,00 до 1:2,25, с переходом через промежуточное состояние (1:1,75,)– кривая 6 (рис.3.36 а,б). На рис. 3.36б представлены УФ-спектры поглощения глутатиона и смесей глутатиона с нитратом серебра в исследуемых соотношениях сразу после приготовления. Через две недели измерений в интенсивности исследуемой полосы поглощения (270 нм) не обнаружено.

Результаты исследования методом УФ-спектроскопии хорошо коррелируют с данными рН-метрии и показали, что при дальнейшем увеличении в соотношении количества добавляемой соли серебра не дает существенных изменений, что также подтверждает целесообразность выбранного исследуемого диапазона соотношений в системе: 1:2,00 и 1:2,25. Также, в результате измерений не наблюдалось наличия полос поглощения, характерных для образования связи S-Ag

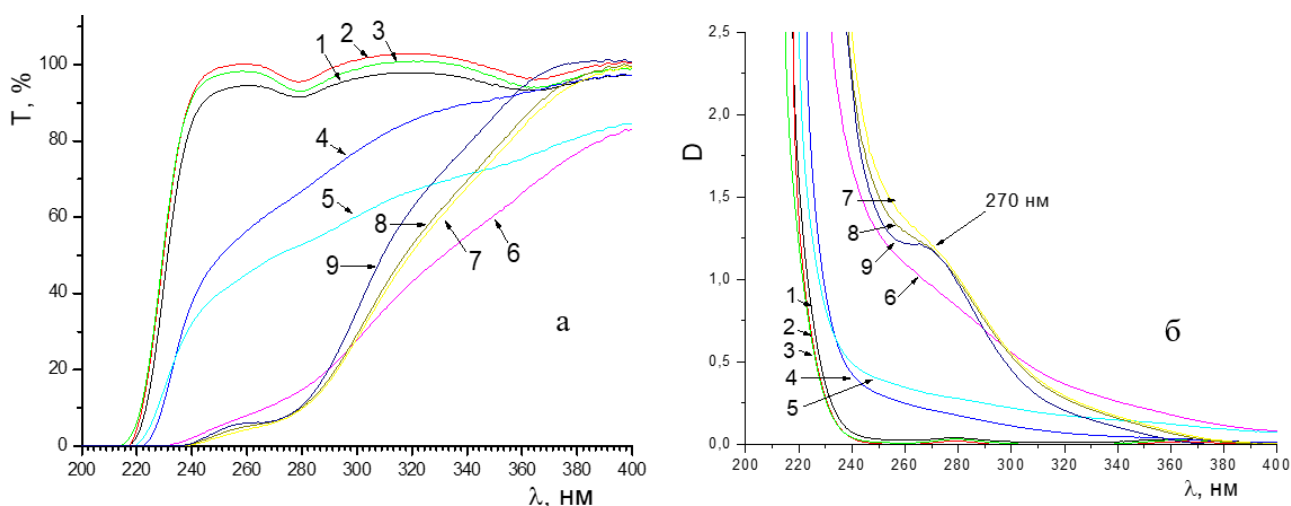


Рис. 3.36. УФ-спектры пропускания (а) и поглощения (б) водных растворов глутатиона с нитратом серебра, в соотношениях: 1:0,25 (1); 1:0,50 (2); 1:0,75 (3); 1:1,00 (4); 1:1,25 (5); 1:1,50 (6); 1:1,75 (7); 1:2,00 (8); 1:2,25 (9), время после смешения - 1 мин. Толщина кюветы d=0,1 см.

в процессе самоорганизации в ЦСР (полосы поглощения в области 390 и 310 нм). При этом, на спектре проявляется полоса 270 нм, которая наблюдается для растворов с наибольшим избытком ионов Ag^+ в исследуемых системах (кривые 8 и 9). Данная полоса поглощения также соответствует образованию связи S-Ag, что доказано изучением процесса самоорганизации в цистеин-серебряных растворах и исследованиям, проведенным группой авторов, доказывающих возможность образования связи S-Ag между нитратом серебра и альбумином [210]. Таким образом, можно судить о том, что процесс самоорганизации в системе GSH/AgNO_3 происходит значительно быстрее (~2 мин), чем в системе L-цистеин/ AgNO_3 (~180 мин), что является явным преимуществом в пробоподготовке образцов и дальнейшем их применении.

Методом ИК спектроскопии было установлено, что взаимодействие молекул глутатиона с нитратом серебра также происходит по $-\text{SH}$ -группе с вытеснением водорода серебром. Об этом свидетельствует отсутствие полосы поглощения 2525 см^{-1} , которая отвечает за валентные колебания SH-группы, для всех исследуемых растворов (рис. 3.37 а). Исчезновение ИК полосы поглощения в области 2525 см^{-1} сопровождалось изменением величины pH раствора (табл.5), особенно существенное подкисление раствора наблюдалось в самый начальный момент введения электролита. Большинство полос относительно глутатиона претерпели изменения. Так, колебания пептидных фрагментов $-\text{CO}-\text{NH}-$ (3247 см^{-1}), вызванная валентными колебаниями N-H пептидной связи в глициновом фрагменте также претерпевает изменения. Она ослабевает и смещается в сторону более низкой частоты колебания с избытком нитрата серебра. Более подробно ИК спектр в области валентных и деформационных колебаний представлен на рис. 3.37 б.

Полоса поглощения 1712 см^{-1} , обусловленная водородными связями димера глутатиона, за счет взаимодействия валентных $\nu(\text{COO}^-)$. При смешении глутатиона с AgNO_3 происходит уменьшение интенсивности данной полосы поглощения с увеличением добавленного нитрата серебра. Это также подтверждается достаточно низким значением pH при увеличении соотношения AgNO_3 к глутатиону. Таким

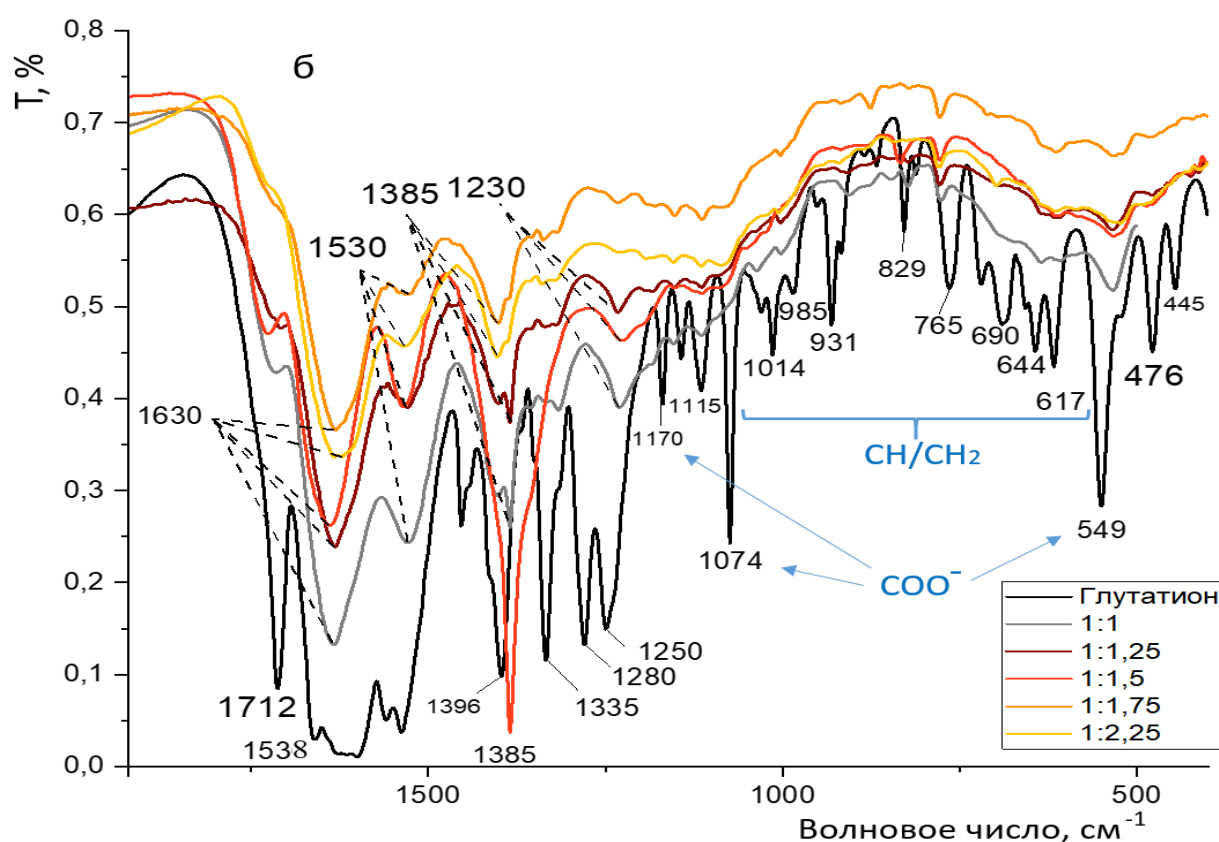
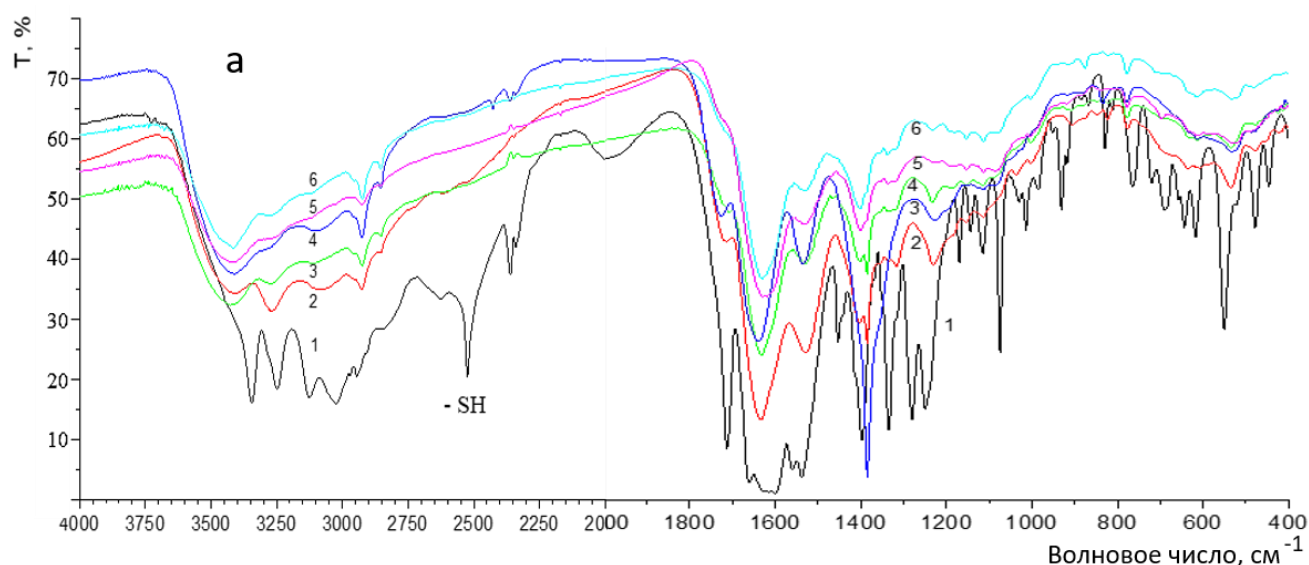


Рис. 3.37. ИК спектр пропускания высушенных образцов глутатиона (1) и GSH/AgNO₃ в соотношениях: 1:1,00 (2); 1:1,25 (3); 1:1,50 (4); 1:1,75 (5); 1:2,25 (6)

образом, можно судить о распаде димерной структуры и еще более сильному протонированию (рН снижается с избытком серебра). Также в глутатионе присутствуют две полосы 1660 и 1538-1530 см⁻¹ (рис. 3.37 б), отвечающие за деформационные колебания протонированной аминогруппы $\delta(\text{NH}^3_+)$, что подтверждается достаточно низким значением рН. В растворе глутатион/нитрат

серебра, данные полосы также присутствуют, однако, с увеличением содержания нитрата серебра происходило уменьшение их интенсивности [208].

Важным отличием является изменение в области 1396 см^{-1} . Данная полоса поглощения соответствует наличию терминальных групп глутаминовой кислоты и глицина, а именно колебаниям $\delta(\text{COO}^-)$. При добавлении AgNO_3 в систему происходит сдвиг полосы поглощения (1385 см^{-1}), и увеличение интенсивности с увеличением в соотношении добавляемого AgNO_3 . Подобный сдвиг отвечает за координацию через карбоксильную группу. Также происходит исчезновение полос поглощения в области $1170\text{--}1074\text{ см}^{-1}$ и 569 см^{-1} , отвечающих за деформационные колебания депротонированных карбоксильных групп $\delta(\text{COO}^-)$ [208]. Следовательно, нитрат серебра взаимодействует не только с тиольной группой, но и карбоксильной группой в глутатионе.

Многие полосы поглощения в глутатионе, отвечающие за деформационные колебания $\delta(-\text{CH}$ и $-\text{CH}_2)$, также претерпели изменения: $1330\text{--}1300\text{ см}^{-1}$ – колебания метиленовых и метиновых групп в алифатических аминокислотах; 1250 см^{-1} – веерные колебания CH_2 -групп, связанных с SH -группой в остатке цистеина; 1014 см^{-1} – скелетные колебания $-\text{CH}_2-$, 829 см^{-1} и 765 см^{-1} – внеплоскостные деформационные колебания $\delta(-\text{CH}$ и $-\text{CH}_2)$ -групп [208].

С помощью метода ДСР было установлены значения дзета-потенциала и размеры частиц в 2-х образцах: GSH/AgNO_3 : 1:2,00 и 1:2,25. Размеры частиц представлены на рис. 3.38. При взаимодействии глутатиона с нитратом серебра образуются рассеивающие частицы, размер которых составляет 2,19 и 249 нм (рис. 3.38). Частично небольшого размера (2,19 нм) отвечают GSH с замещенным на серебро атомом

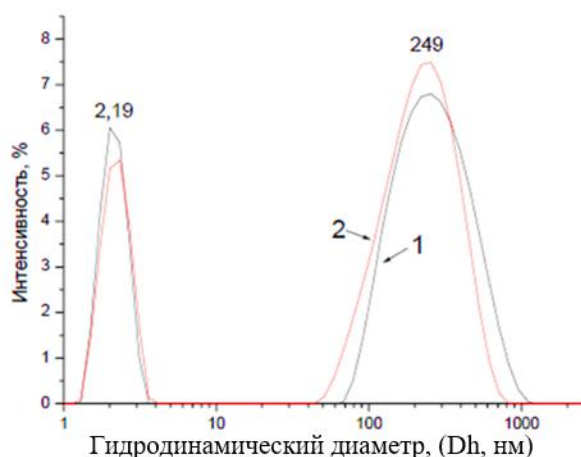


Рис. 3.38. Распределение рассеивающих частиц по размерам в водных растворах GSH/AgNO_3 : 1:2,00 (1), 1:2,25 (2); $T=27^\circ\text{C}$

водорода в тиольной группе, а крупные частицы (249 нм) комплексам из взаимодействующих между собой малых частиц.

Введение различных электролитов в созревший раствор GSH/AgNO₃ не приводило к образованию гидрогеля, что вызвано, скорее всего, более сложным химическим строением и размерами основной структурной единицы в результате стерических препятствий при формировании пространственной гель-сетки.

Дзета-потенциал в исследуемых образцах имеет положительное значение: для раствора с соотношением GSH/AgNO₃ 1:2,00 равен +13,3 мВ, а с соотношением 1:2.25 равен +13,6 мВ. Положительные значения дзета-потенциала свидетельствует о наличии положительного заряда на адсорбционном слое образующихся частиц – ассоциатов в ходе процесса самоорганизации.

Таким образом, исходя из полученных результатов ИК и УФ спектроскопии, а также реологических исследований, можно предположить механизм взаимодействия глутатиона с нитратом серебра (рис. 3.39) в исследуемых соотношениях. При взаимодействии глутатиона и нитрата серебра в соотношении 1:1,25 – 1:1,75 происходит координирование иона Ag⁺ с тиольной группой цистеина, входящего в состав глутатиона, однако, подобные системы не стабильны и выпадают со временем в осадок (рис. 3.34). Методом ИК спектроскопии

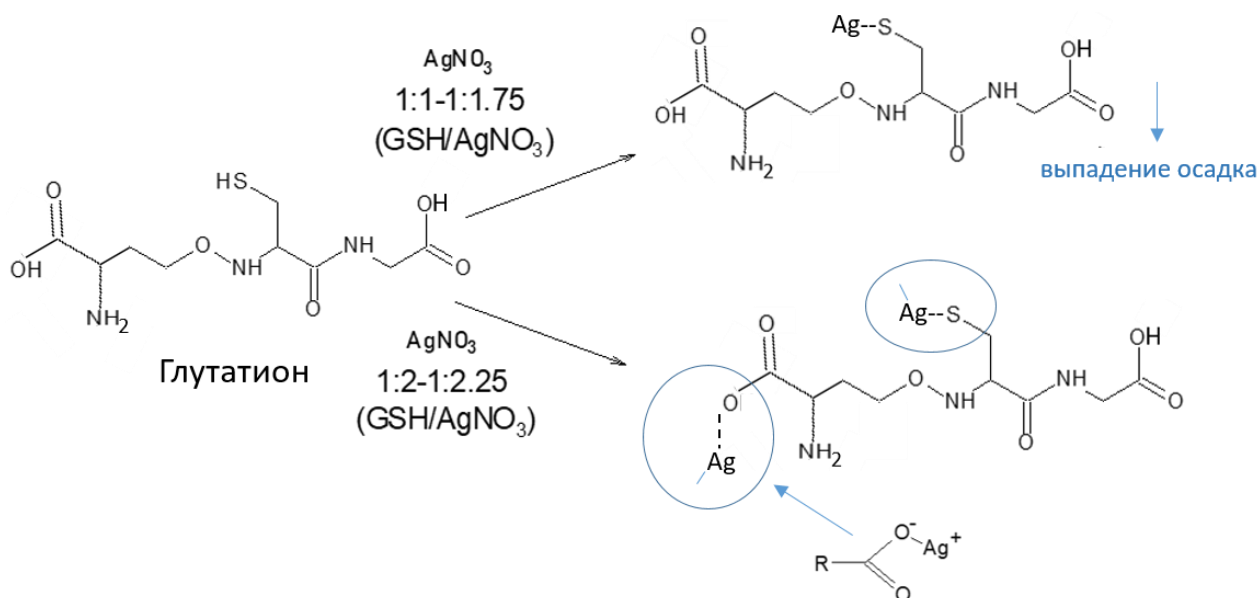


Рис. 3.39. Схема предположительного механизма взаимодействия глутатиона и нитрата серебра

установлено (рис. 3.38), что при увеличении концентрации нитрата серебра в исследуемых системах (в соотношении 1:2,00 и 1:2,25) происходит координирование избытка ионов серебра с карбоксильными группами глутаминовой кислоты, входящей в состав глутатиона. Получение гидрогеля устойчивых соотношений GSH/AgNO_3 с электролитами в тех же концентрациях, что при взаимодействии с ЦСР на данном этапе получить не удалось, что связано, скорее всего, со стерическими особенностями строения молекулы в растворе GSH/Ag^+ .

ГЛАВА 4. ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ЦСР

Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), рак остается второй по частоте причиной смерти во всем мире [211]. Возможности химиотерапии становятся все более ограниченными из-за развития лекарственной устойчивости, токсичности препаратов, различных побочных эффектов и т. д. В связи с этим приоритетной задачей является синтез и изучение новых безопасных составов, обладающих высокой активностью. Особое место среди таких соединений занимают гели. В большинстве случаев лечение рака осуществляется путем системного введения или перорального приема препаратов; однако локальное введение может быть весьма эффективным при неоперабельных опухолях или новообразованиях, удаленных хирургическим путем не полностью. В этом контексте перспективными материалами могут служить гели, реагирующие на стимулы и созданные на основе низкомолекулярных гелеобразователей. В настоящей работе мы изучили и сравнили активность ЦСР и гидрогелей с разными катионами (Na^+ , Cu^{2+}) и анионами (SO_4^{2-} и F^-), в отношении клеток плоскоклеточной карциномы человека линии SiHa; данная опухоль является вторым по распространенности злокачественным новообразованием кожи. Одной из важных областей практического применения исследуемого ЦСР и гидрогелей на его основе является медицинская область. Одними из приоритетных направлений в данной отрасли являются микробиология и онкотерапия: возможность замедлять рост раковых клеток, блокировать общие механизмы выживания злокачественных новообразований, поиск новых методов получения лекарств и способов переноса активного лекарственного вещества к месту поражения, а также создание новых препаратов (веществ), которые воздействуют точно по измененным клеткам, не повреждая здоровые.

В связи с этим объекты, изучаемые в данной работе (ЦСР, гидрогели на его основе, системы с глутатионом и метиленовым синим [212]) были исследованы именно на предмет воздействия на рост раковых клеток и здоровых клеток

человека. Получение положительного результата в данном направлении может дать развитие огромной отрасли медицины. В данной работе использовались коммерчески доступные стандартные культуры клеток человека: две линии раковых клеток и две линии нормальных (здоровых) клеток человека.

4.1. Анализ проявления микробиологической активности и способности к подавлению роста раковых клеток выбранных катионов и анионов исследуемых гидрогелей

Проведено исследование на влияние ЦСР и гидрогелей на его основе на жизнеспособность клеток карциномы молочной железы линии MCF-7 и живых клеток HaCat. Установлено, что гидрогели с катионом Cu^{2+} сильнее других катионов подавляют рост раковых клеток и уменьшают этот показатель со 100 % до ~20% (рис. 4.1),

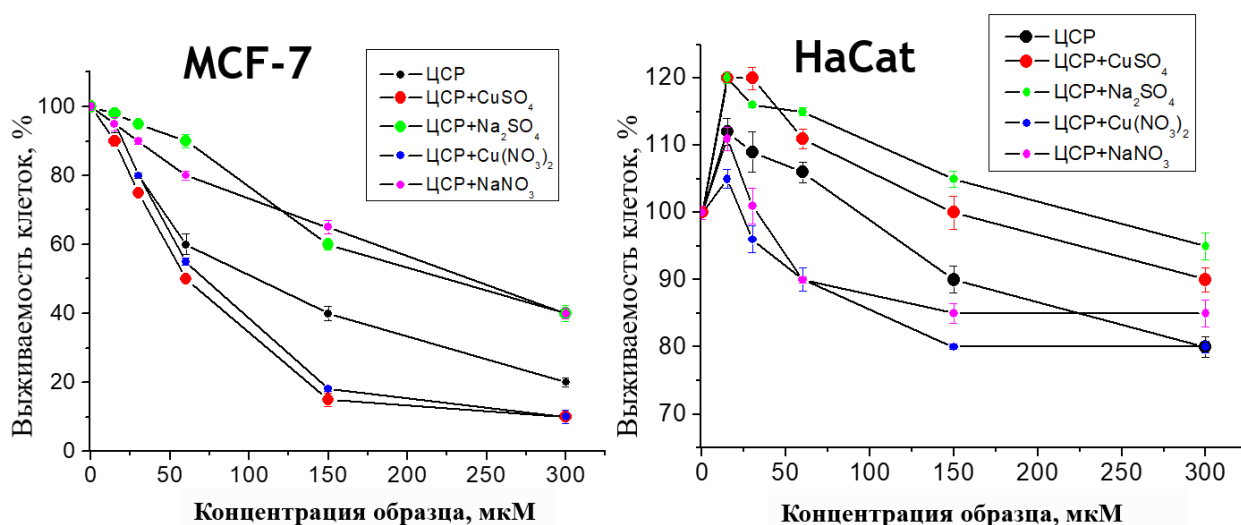


Рис. 4.1. Цитотоксичность (МТТ-тест) ЦСР ($C = 1 \cdot 10^{-3} \text{M}$) и гидрогелей ($C_{\text{эл-та}} = 1,00 \text{ mM}$) на жизнеспособность клеток карциномы молочной железы линии MCF-7 и живых клеток HaCat

не нанося существенного вреда живым клеткам организма HaCat, где показатель жизнеспособности здоровых клеток составил ~80 % от первоначального (рис. 4.1).

Также результаты исследований показали, что токсичность гидрогелей на основе фторид-анионов в отношении клеток Wi-38 (здоровых клеток человека) была довольно высокой, но только для образцов с высокой концентрацией F^- (рис.

4.2 б). Гидрогели на основе анионов SO_4^{2-} и F^- не проявляли токсичности по отношению к клеткам Wi-38 и обладали низкой токсичностью, ЦСР обладал низкой SiHa гораздо выше токсичности ЦСР и гидрогелей на основе F^- . Такую же токсичность F^- -анионы проявили и в отношении здоровых клеток Wi-38.

Интересным является тот факт, что в составе гидрогеля F^- -анион не проявляет негативного на рост здоровых клеток.

Все гидрогели на основе F^- сильно подавляли клетки SiHa при концентрации образца 300 мкМ, в то время как показатель гидрогеля на основе SO_4^{2-} был практически нетоксичным (рис. 4.2 в). Инкубация клеток SiHa и Wi-38 с исследуемыми системами проводилась в течение 48 ч.

Сопоставляя полученные результаты, можно сделать вывод, что введение фторид-анионов в структуру ЦСР приводит к аддитивному эффекту. При этом

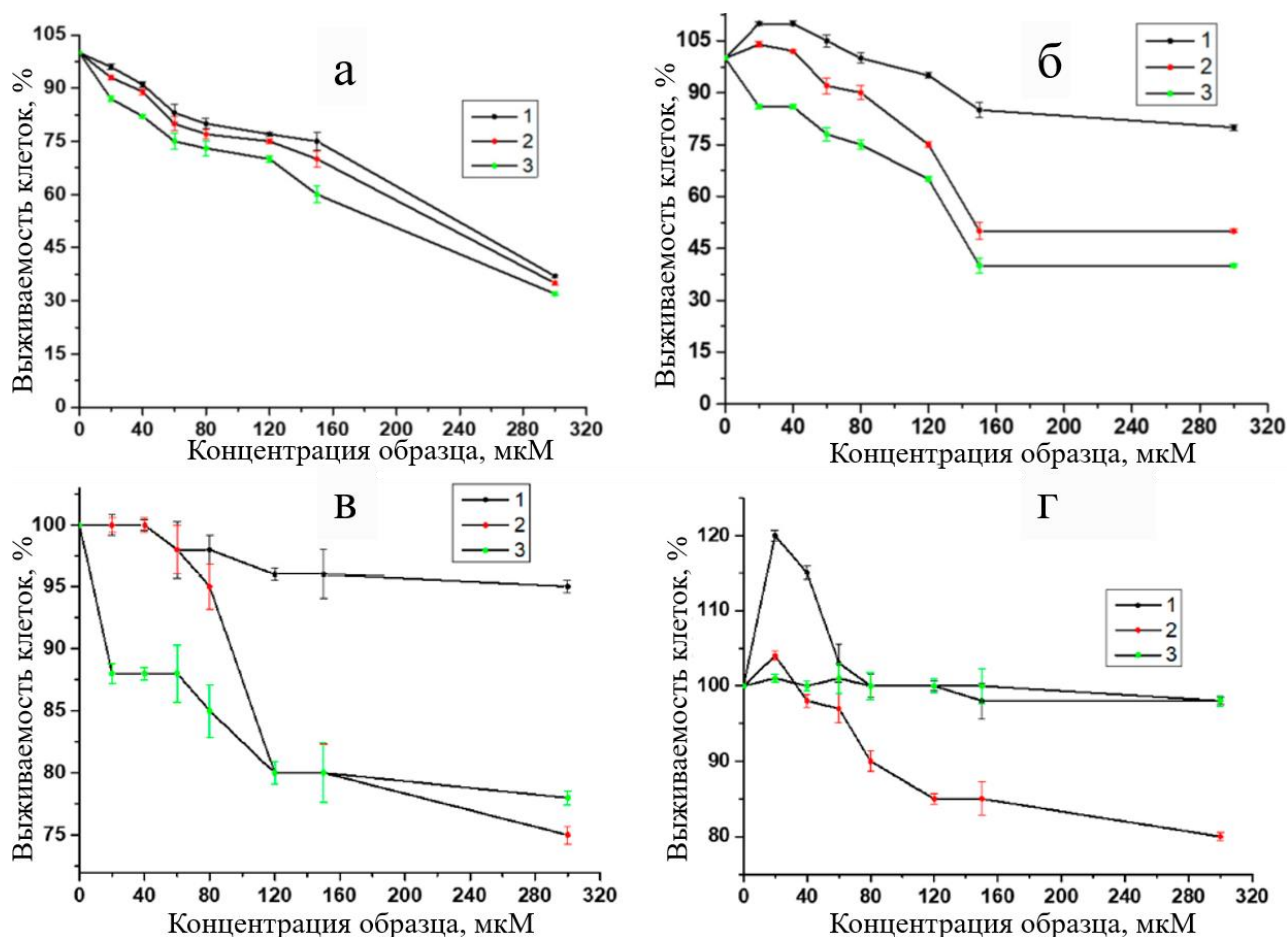


Рис. 4.2. Цитотоксичность (МТТ-тест) F^- -аниона в отношении клеток (а) SiHa и (б) Wi-38 при различных концентрациях аниона (мМ): 1—3,1; 2—3,5; 3—3,9. Цитотоксичность (МТТ-тест) гидрогеля на основе Na_2SO_4 (1), ЦСР (2) и NaF (3) в отношении клеток (в) SiHa и (г) Wi-38.

механизм воздействия гелей на клетки, по-видимому, связан с токсичностью самих фторид-анионов, для которых наночастицы ЦСР служат носителем. Хорошо известно, что при концентрациях ниже 200 мкМ (что соответствует суточной потребности организма) фторид-анионы способствуют росту костей и здоровью зубов, однако их избыток может вызывать флюороз, кроме того, основные механизмы токсического действия фторид-ионов связаны с ингибированием белков, нарушением функций органелл, изменением pH и нарушением электролитного баланса, что подтверждается негативным влиянием F⁻-анионов на здоровые клетки при введении без гидрогеля (рис. 4.2 б). Таким образом, установлено, что полученные гидрогели могут быть использованы в качестве эффективного средства для подавления роста раковых клеток.

4.2. Анализ проявления микробиологической активности и способности к подавлению роста раковых клеток выбранных композиций GSH/AgNO₃

Исследована цитотоксичность стабильных систем GSH/AgNO₃ в соотношении 1:2,00 и 1:2,25 на клетки плоскоклеточной карциномы шейки матки человека SiHa и эпителиоподобные клетки, выделенные из инвазивной аденокарциномы молочной железы женщины MCF-7. Установлено, что при взаимодействии выбранных соотношений происходит гибель клеток как MCF-7

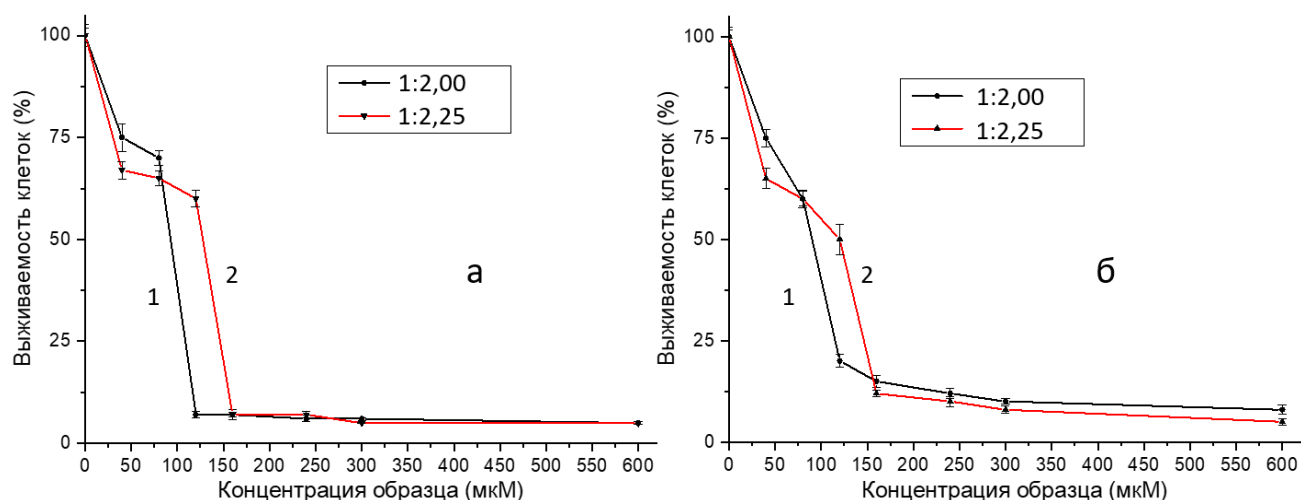


Рис. 4.3. Цитотоксичность (МТТ-тест) систем GSH/AgNO₃ в отношении клеток (а) MCF-7 и (б) SiHa в соотношении 1:2,00 (1) и 1:2,25 (2)

(рис. 4.3 а), так и SiHa (рис.4.3 б). В начале при добавлении минимальной концентрации 50 - 100 мкМ в обоих случаях происходит скачкообразное уменьшение роста раковых клеток. В отношении клеток MCF-7 происходит уменьшение значения (рис.4.3 а) до 75 % при добавлении соотношения 1:2,00 и до 64-67 % при добавлении соотношения 1:2,25 в концентрации 50 мкМ, и уменьшение значения до 70 % при добавлении соотношения 1:2,00 и до 63 % при добавлении соотношения 1:2,25 в концентрации 100 мкМ. При дальнейшем увеличении концентрации происходит резкий спад показателей роста раковых клеток в обоих случаях до ~6%.

Подобная тенденция наблюдается и при взаимодействии исследуемых систем GSH/AgNO₃ в отношении клеток SiHa (рис.4.3 б). Стоит отметить, что для данного типа раковых клеток происходит более резкий спад значений выживаемости клеток. Так, в начальной концентрации 50 - 100 мкМ при добавлении соотношения 1:2,00 происходит уменьшение значения также до 62 %. При добавлении максимальной концентрации 300 мкМ рост клеток сократился до ~10 %.

Таким образом, установлено, что исследуемые системы на основе раствора GSH/AgNO₃ способны оказывать негативное влияние на рост раковых клеток типа MCF-7 и SiHa.

4.3. Возможность применения гидрогеля в качестве матрицы-переносчика для активного вещества – метиленового синего

Борьба с социально значимыми заболеваниями и их профилактика — одна из наиболее актуальных задач современности. При этом злокачественные новообразования представляют собой чрезвычайно сложную проблему для общества и государства в целом. Среди них плоскоклеточная карцинома (ПМК) — метастазирующее заболевание, относящееся к немеланомным видам рака кожи, — занимает второе место по распространенности среди злокачественных новообразований кожи. Существует ряд общепринятых методов лечения ПМК.

Один из них – метод Фотодинамической терапии (ФДТ). Метод основан на использовании фотосенсибилизаторов (ФС) — веществ, чувствительных к свету и лазерному излучению низкой интенсивности с длиной волны, соответствующей пику поглощения данного фотосенсибилизатора. В результате этого процесса происходит генерация активных форм кислорода (АФК), что в конечном итоге приводит к гибели раковых клеток. Одним из перспективных фотосенсибилизаторов является - метиленовый синий. Однако ограничение применения этого красителя в клинической практике связано с его быстрым ферментативным восстановлением и переходом в бесцветную лейкоформу в биологической среде. Кроме того, из-за гидрофобности структуры молекулы метиленового синего склонны к агрегации в водной среде, что приводит к снижению их активности в генерации активных форм кислорода.

Решением описанной выше проблемы является создание различных носителей на основе органических (липосомы и полимеры) и неорганических веществ, предотвращающих преждевременную потерю активности фотосенсибилизаторов (ФС). Таким образом, были проведены исследования по применению рассматриваемого в данной работе гидрогеля на основе ЦСР и электролитов в качестве матрицы-переносчика для метиленового синего.

В данной работе в качестве источника анионов использовался сульфат меди (CuSO_4). Концентрации ЦСР и CuSO_4 поддерживались постоянными (1,0 мМ), а содержание метиленового синего варьировалось в широком диапазоне (табл. 3). В результате установлено, что при внесении в гидрогель метиленового синего наблюдается образование стабильных гидрогелей при концентрациях метиленового синего от $1,0 \cdot 10^{-3}$ мМ до 1,3 мМ (рис. 4.4). При этом не отмечалось расслоения или опалесценции, что свидетельствует о хорошей совместимости метиленового синего и гидрогеля на основе ЦСР с CuSO_4 . Также установлено, что полученные гидрогели обладают тиксотропными свойствами [212].

Для дальнейшего исследования были выбраны 4 основные концентрации метиленового синего: №1 - $1,0 \cdot 10^{-3}$ мМ; №2 - $1,0 \cdot 10^{-2}$ мМ; №3 - $1,0 \cdot 10^{-1}$ мМ; №4 - 1,0 мМ. На рис. 4.5 представлены кинетические кривые изменения вязкости гидрогеля

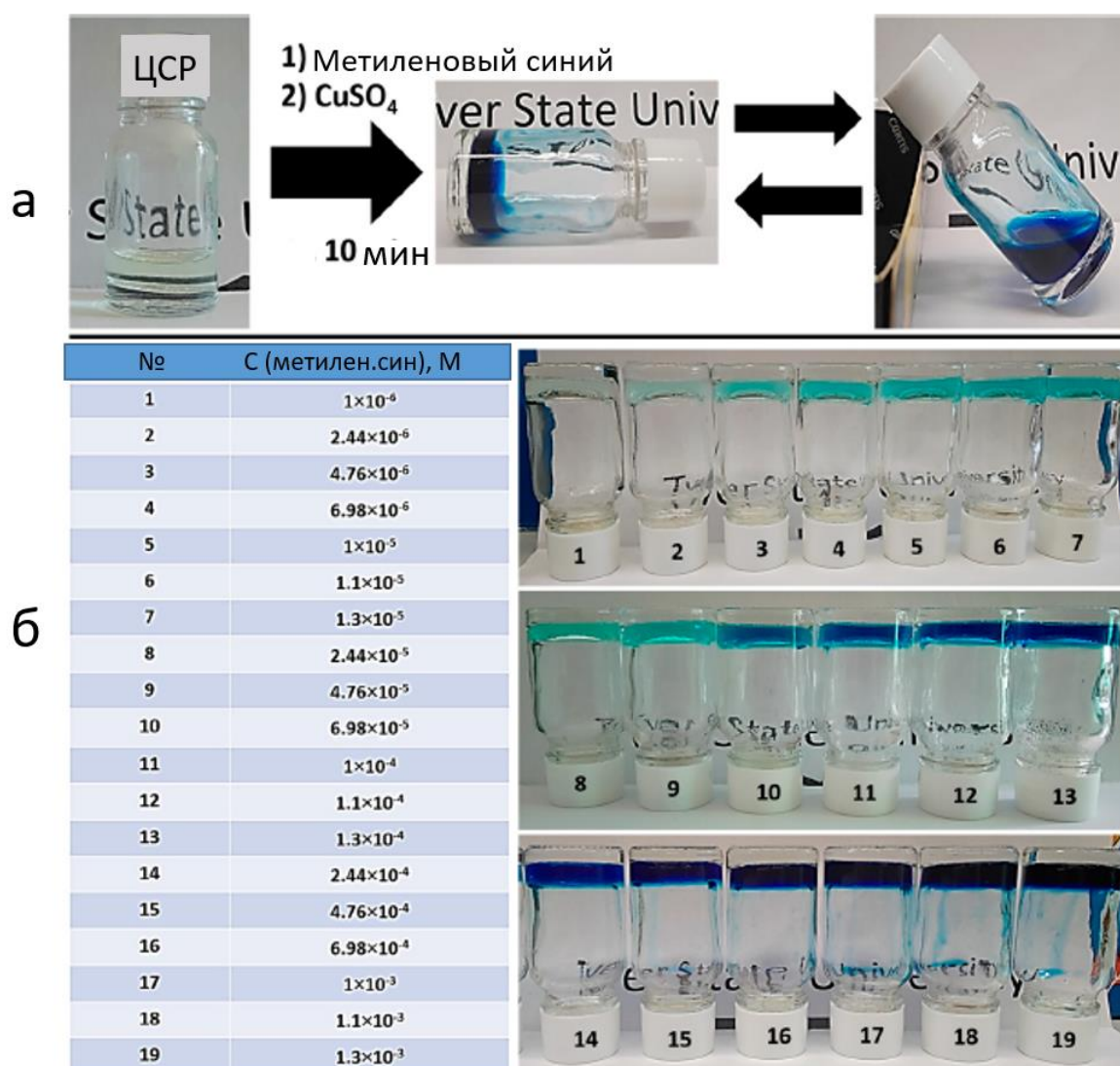


Рис. 4.4. Фотография процесса гелеобразования в ЦСР с CuSO_4 и связывания с метиленовым синим (а) и таблица концентрационного диапазона трехкомпонентных гидрогелей с метиленовым синим (б)

с метиленовым синим и зависимость этого параметра от концентрации.

Видно, что все кривые практически сразу выходят на постоянное значение (рис. 4.5 а). В диапазоне концентраций метиленового синего до $1,0 \cdot 10^{-3}$ мМ вязкость гелей изменяется незначительно по сравнению с вязкостью геля, не содержащего красителя (рис. 4.5 а, кривая 0). При этом резкий скачок вязкости геля наблюдается при увеличении концентрации метиленового синего до значения ~ 14 отн.ед. (рис.4.5 б).

Методом УФ спектроскопии исследовали влияние на структуру гель-сетки в результате добавления метиленового синего к гидрогелю на основе ЦСР и CuSO_4 .

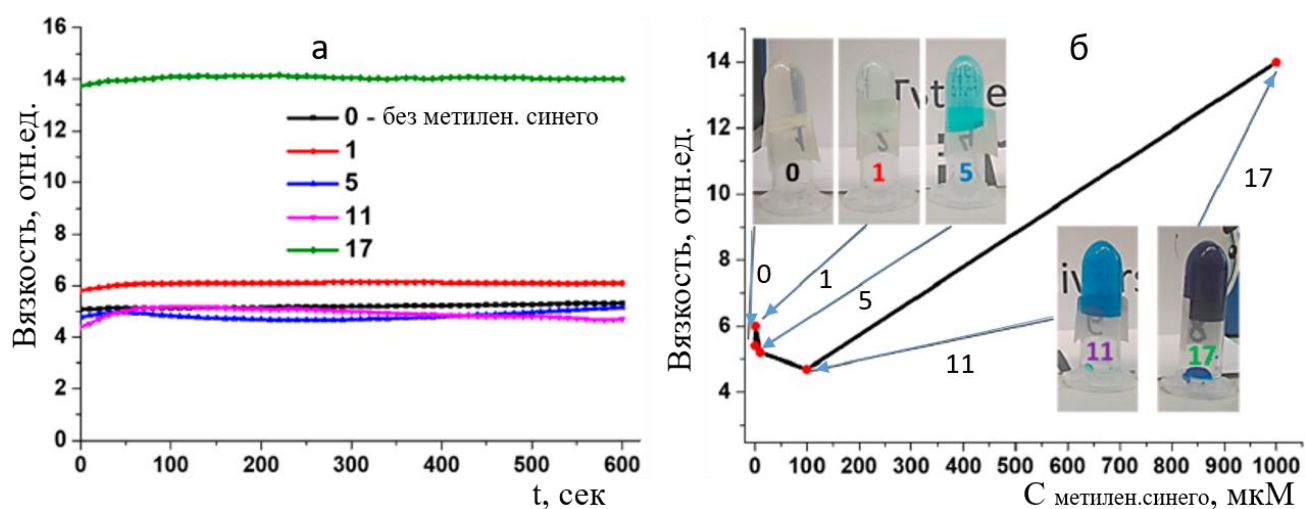


Рис. 4.5. Зависимость изменения вязкости от времени в гидрогеле ЦСР/ CuSO_4 (0) с добавлением метиленового синего в концентрации: $1,0 \cdot 10^{-3}$ (1); $1,0 \cdot 10^{-2}$ (5); $1,0 \cdot 10^{-1}$ (11); 1,0 (17) мМ.

В связи с тем, что ЦСР и метиленовый синий имеют характерные полосы поглощения в видимом диапазоне спектра, метод УФ- и видимой спектроскопии может предоставить некоторую информацию об их взаимодействиях (рис. 4.6). Полосы при 310–320 нм и 390–410 нм соответствуют металлофильным взаимодействиям в комплексах цистеин/ Ag^+ и поверхностному плазмонному резонансу наночастиц серебра, соответственно. Поглощение при 613 и 665 нм отвечает за π - π^* и n - π^* электронные переходы в структуре метиленового синего. В результате установлено, что электронные спектры обеих систем не изменяются при

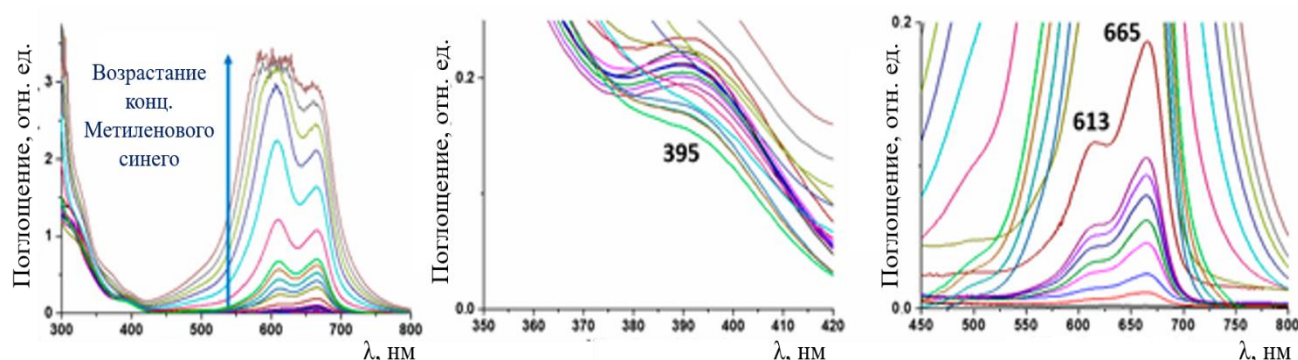


Рис. 4.6. Спектры поглощения в Уф и видимом диапазоне при добавлении метиленового синего в концентрационном диапазоне от $1,0 \cdot 10^{-3}$ до 1,3 мМ к гидрогелю на основе ЦСР и CuSO_4 в концентрации 1,0 мМ

смешении ЦСР, CuSO_4 и метиленового синего. Это означает, что взаимодействие между исходными структурами довольно слабое, однако, метиленовый синий

плотно удерживается внутри структуры гидрогеля в течение 6 месяцев, что подтверждается визуальными наблюдениями (рис. 4.4), а значит гидрогель возможно использовать в качестве матрицы-переносчика для данного активного вещества.

Увеличение содержания красителя в геле приводит к росту соответствующих полос поглощения. Поскольку в данной работе не ставилась задача проведения количественного анализа, мы приводим результаты для значений поглощения, равных единице — области, где закон Бугера–Ламберта–Бера уже не является линейным. Можно отметить, что повышение концентрации красителя отражается на изменении соотношения интенсивностей полос 613 и 665 нм. Хорошо известно, что полоса при 665 нм связана с мономерным состоянием метиленового синего, а полоса при 613 нм — с димерами метиленового синего. Соотношение этих форм не превышает единицы вплоть до концентрации красителя $1 \cdot 10^{-1}$ мМ. Этот факт имеет большое значение для фотодинамической терапии (ФДТ), так как именно мономерная форма обеспечивает высокий квантовый выход данного фотосенсибилизатора.

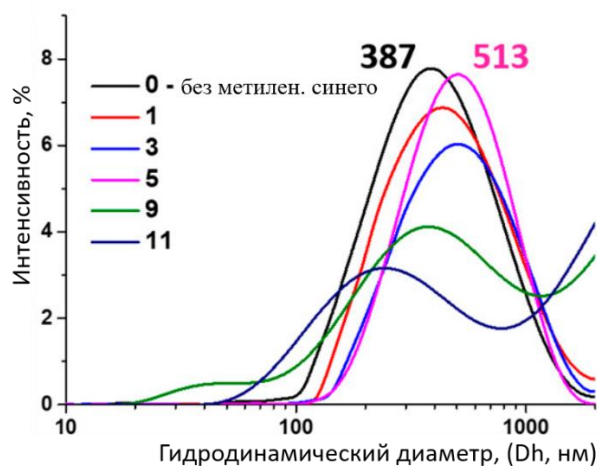


Рис. 4.7. Распределение рассеивающих частиц по размерам гидродинамического диаметра в гидрогеле ЦСР/ CuSO_4 с добавлением метиленового синего в концентрации: $1,00 \cdot 10^{-3}$ (1); $4,76 \cdot 10^{-3}$ (3); $1,00 \cdot 10^{-2}$ (5); $4,76 \cdot 10^{-2}$ (9); $1,00 \cdot 10^{-1}$ (11) мМ

Методом ДРС установлено, что распределение частиц по размерам в полученных системах является мономодальным (рис. 4.7). Размер частиц постепенно увеличивается по мере роста содержания метиленового синего. При этом, начиная с определенной концентрации красителя, анализ систем методом динамического светорассеяния (ДСР) становится невозможным из-за образования вязкого гидрогеля. Это явление обусловлено тем, что длина волны

лазера в методе ДРС составляет 633 нм, что соответствует среднему значению максимума поглощения метиленового синего. В результате вместо рассеяния краситель поглощает практически весь свет. Результаты измерения дзета-потенциала для исследуемых гидрогелей с метиленовым синим представлены на рис. 4.8. Установлено, что для гидрогеля с CuSO_4 значение дзета-потенциала составляет +50 мВ, при введении метиленового синего происходит увеличение дзета-потенциала до концентрации $1,00 \cdot 10^{-2}$ мМ (дзета-потенциал равен +67 мВ), при дальнейшем увеличении концентрации происходит уменьшение дзета-потенциала, так при введении концентрации 1,00 мМ значение дзета-потенциала составило +28 мВ.

Это связано с тем, что при низком содержании красителя в системе молекулы метиленового синего взаимодействуют с поверхностью частиц ЦСР, образующих каркас гидрогеля; вероятно, это взаимодействие носит характер слабых ион-ионных или ион-дипольных взаимодействий между центрами $=\text{S}^+$ или $=\text{N}^+$ молекул метиленового синего и группами $-\text{COO}^-$ или $-\text{SO}_4^{2-}$ частиц цистеин-серебряного гидрогеля. На это указывают данные динамического светорассеяния (ДСР) и результаты измерений дзета-потенциала. При высоких концентрациях красителя

его молекулы начинают дополнительно вытеснять частицы цистеин-серебряного гидрогеля и способствовать их концентрированию вследствие отталкивания одноименно заряженных

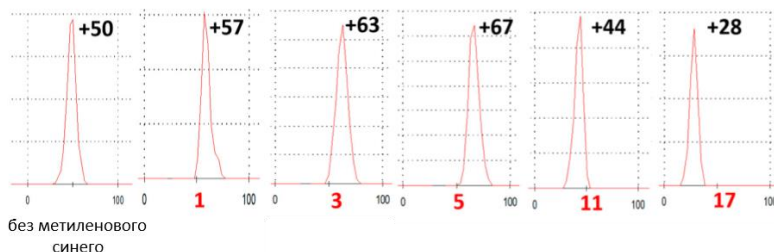


Рис.4.8. Дзета-потенциал в гидрогеле ЦСР/ CuSO_4 с добавлением метиленового синего в концентрации: $1,00 \cdot 10^{-3}$ (1); $4,76 \cdot 10^{-3}$ (3); $1,00 \cdot 10^{-2}$ (5); $1,00 \cdot 10^{-1}$ (11); 1,00 (17) мМ.

частиц, что приводит к образованию более крупных агрегатов. При этом линейная плотность заряда на их поверхности снижается. Данный вывод подтверждается результатами измерений дзета-потенциала, а также данными методов СЭМ (рис. 4.9) и вискозиметрии (рис. 4.5).

Морфология полученных гидрогелей представлена на рис. 4.9. Каркас

образующегося гидрогеля имеет лентовидную волокнистую структуру. Гидрогель

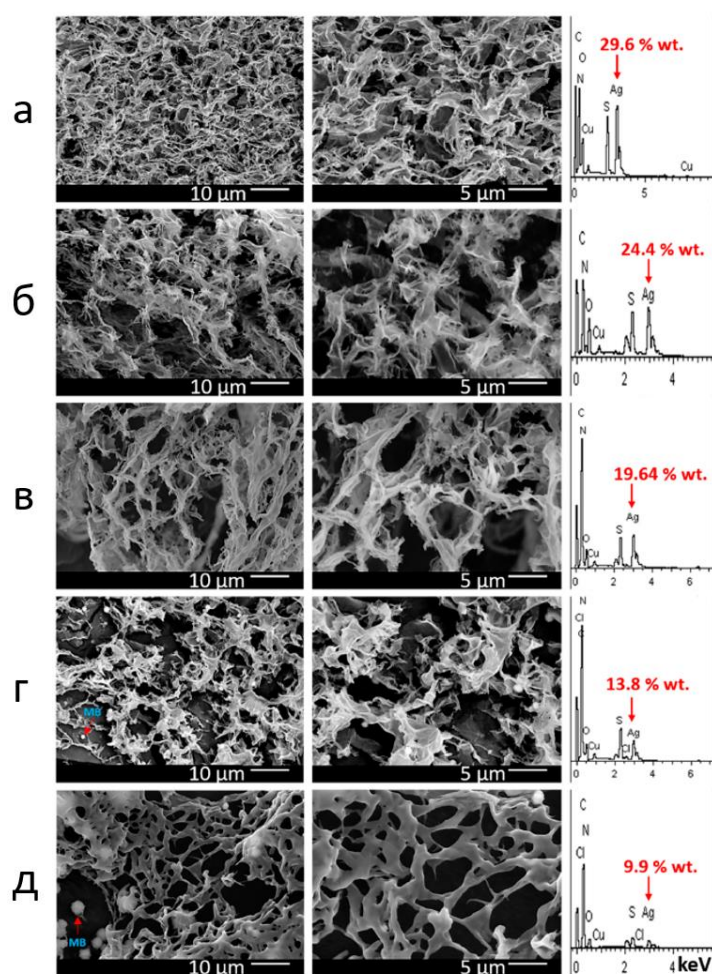


Рис. 4.9. Микрофотографии гидрогелей с ЦСП/CuSO₄ (а) при добавлении метиленового синего в концентрациях: $1,0 \cdot 10^{-3}$ (б); $1,0 \cdot 10^{-2}$ (в); $1,0 \cdot 10^{-1}$ (г); 1,0 (д) мМ

без добавления метиленового синего характеризуется довольно плотной сеткой (рис. 4.9 а). По мере увеличения содержания красителя структура геля становится более разреженной. Одновременно с этим волокна гель-сетки утолщаются, а характер их поверхности меняется со складчатого на гладкий при переходе к максимальной концентрации красителя (рис. 4.9 д). Полученные результаты хорошо согласуются с данными вискозиметрического анализа (рис. 4.5). Начиная с концентрации красителя 10^{-1} мМ, наряду с волокнистой структурой

гель-сетки, наблюдаются также сферические включения (рис. 4.9 г, д). Размер этих частиц увеличивается по мере роста концентрации метиленового синего. Кроме того, данные образования присутствуют как внутри волокон гель-сетки, так и за их пределами. Можно предположить, что эти частицы возникают в результате агрегации молекул метиленового синего при удалении растворителя в процессе анализа образца. Действительно, метиленовый синий представляет собой кристаллическое соединение, не имеющее температуры кипения. Результаты элементного анализа подтверждают это предположение (рис. 4.9 г, д): при сканировании исследуемых участков обнаруживаются следы хлора — противоиона, входящего в состав молекулы метиленового синего. Также следует

отметить снижение содержания серебра при переходе к гелям с более высокой концентрацией метиленового синего. Промежуточные данные указывают на возможность взаимодействия молекул метиленового синего с каркасом геля, формирующимся из исходных частиц ЦСР.

Установлено, что исследуемые образцы гидрогелей с метиленовым синим проявляют биоактивность в отношении раковых и нормальных клеток человека (рис. 4.10). Видно, что все образцы оказывают сильное токсическое воздействие на клетки SiHa даже без лазерного облучения уже при концентрации 60 мкМ (рис. 4.10 а). Введение красителя в гидрогель существенно повышает эффективность получаемых трехкомпонентных гидрогелей (рис. 4.10 а, образцы 15 и 17). В данном случае активность геля возрастает вдвое при концентрациях 150 и 300 мкМ, что свидетельствует об аддитивном эффекте системы. В то же время при низкой концентрации гидрогеля (40 мкМ) наблюдается синергетический эффект, поскольку токсичность системы возрастает в 3–4 раза.

Цитотоксичность всех гелей в отношении клеток HaCaT примерно одинакова и не превышает значения 50 % (рис. 4.10 в).

Лазерное облучение образцов при длине волны 638 нм приводит к повышению активности гелей в 2–3 раза; это особенно характерно для низких концентраций для гидрогеля без метиленового синего (60 мкМ) и с метиленовым синим (2–20 мкМ) в составе гидрогелей (рис. 4.10 б). При этом синергетический эффект сохраняется. В данных условиях здоровые клетки получают значительные повреждения даже при низких концентрациях образца (рис. 4.10 г). Этот факт необходимо учитывать при проведении процедуры фотодинамической терапии (ФДТ), когда облучение поврежденного участка кожи должно осуществляться точно.

При фотоактивации метиленовый синий генерирует цитотоксические активные формы кислорода (АФК), включая синглетный кислород (O_2). Все системы способны генерировать АФК даже в отсутствие облучения (рис. 5а, в). Установлено, чем выше содержание частиц гидрогеля на основе ЦСР/ $CuSO_4$ и метиленового синего, тем сильнее выражен этот эффект. При этом для образцов

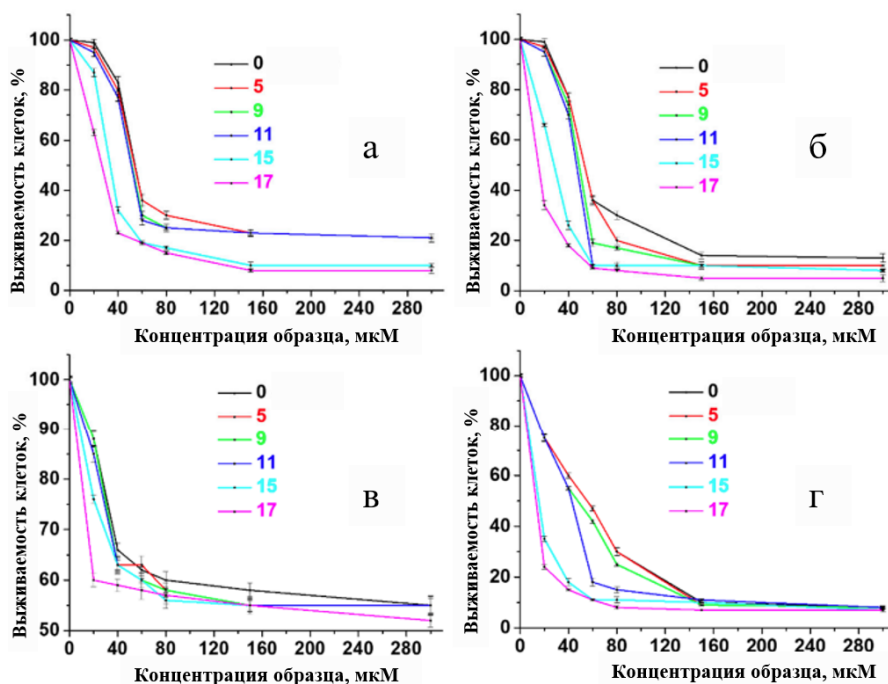


Рис. 4.10. Цитотоксичность (МТТ-тест) гидрогелей на основе ЦСП/ CuSO_4 (0) и метиленового синего в отношении клеток (а, в) SiHa и (б, г) HaCaT при различных концентрациях (мМ): $1,00 \cdot 10^{-2}$ (5); $1,00 \cdot 10^{-2}$ (9); $1,00 \cdot 10^{-1}$ (11); $4,76 \cdot 10^{-1}$ (15); 1,00 (17) в отсутствии облучения (а, в) и при облучении при 638 нм (б, г)

конечном итоге приводит к эффекту поглощения падающего излучения и снижению выхода АФК. Данный факт также подтверждается результатами УФ-спектроскопии и метода динамического светорассеяния (ДСР). В образцах, не подвергавшихся облучению, среднее содержание АФК в клетках SiHa в 2–3 раза выше, чем в клетках HaCat (рис. 4.10 а, в). Вероятно, это связано с более интенсивным захватом различных материалов раковыми клетками по сравнению с нормальными. При фотодинамическом воздействии содержание АФК возрастает в 1,5–2 раза в клетках SiHa и в 3–4 раза в клетках HaCat по сравнению с необлученными образцами. Эти результаты полностью согласуются с данными МТТ-теста. Кроме того, следует отметить, что при низких концентрациях образца синергический эффект не наблюдается, тогда как при более высоких концентрациях он проявляется. Таким образом, можно сделать вывод, что свободнорадикальное окисление не является единственным механизмом гибели клеток. Этот факт чрезвычайно важен для практического применения, поскольку

15 и 17, характеризующихся более высоким содержанием красителя по сравнению с остальными образцами, наблюдается зависимость куполообразного типа. Это может быть обусловлено агрегацией молекул МС и образованием их димерных форм, что в

чем больше мишеней для действия препарата, тем ниже вероятность развития резистентности патологических клеток к нему.

Остановка клеточного цикла является основным показателем эффективности ФДТ при лечении рака. Дополнительно проведены исследования распределения клеточных популяций SiHa и HaCat, обработанных гидрогелями, по различным фазам деления. Общее количество активно делящихся клеток в синтетической фазе (S) и фазе деления клеток (G2-M) примерно одинаково для всех образцов в случае раковых клеток SiHa. Видно, что наибольшее число клеток в фазе апоптоза (subG0-G1), а именно программируемой гистологической гибели клеток, было выявлено для геля без метиленового синего как без облучения, так и при воздействии излучения. Тем не менее, все образцы вызвали остановку клеточного цикла в данной фазе. При этом включение метиленового синего в состав геля и увеличение его концентрации приводили к усилению этого эффекта примерно на 10%. Количество таких клеток практически не меняется ни в отсутствие облучения, ни в ходе фотодинамической терапии. К такому результату могут приводить как наночастицы серебра, так и метиленовый синий.

В случае нормальной клеточной линии HaCat доля клеток в фазе апоптоза значительно выше по сравнению с клетками SiHa. Также наблюдается остановка клеточного цикла в фазе G0-G1. Однако содержание клеток в фазе subG0-G1 значительно ниже для гелей с метиленовым синим, тогда как количество делящихся клеток в фазах роста клеток (S и G2-M) выше — как в отсутствие облучения, так и при его воздействии. Эти факты, вероятно, обусловлены различной природой данных клеточных линий, а также физико-химическими свойствами систем в условиях отсутствия и наличия облучения.

В заключение следует отметить, что впервые были синтезированы новые супрамолекулярные фотоактивные гидрогели на основе ЦСП/CuSO₄ и метиленового синего. Образование стабильных гелей происходит в диапазоне концентраций метиленового синего от 10⁻⁶ до 10⁻³ М. При увеличении концентрации красителя вязкость гелей изменяется скачкообразно. Волокна гелевой сетки утолщаются, а структура их поверхности меняется с морщинистой

на гладкую только при максимальной концентрации метиленового синего. Молекулы метиленового синего взаимодействуют с поверхностью наночастиц в гидрогеле, не влияя при этом на стабильность геля или подавление активности красителя. Полученные «фотогели» продемонстрировали синергетический эффект подавления плоскоклеточной карциномы при низкой токсичности для кератиноцитов в микромолярных концентрациях ЦСР (60 мкМ) и метиленового синего (10 мкМ) как в отсутствие облучения, так и в ходе фотодинамической терапии. Гидрогели воздействуют на раковые клетки по нескольким механизмам, включая возможность протекания свободнорадикального окисления даже без светового облучения. Данные системы способны останавливать клеточный цикл путем его блокирования в фазе G0–G1 как без облучения, так и при проведении фотодинамической терапии. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение взаимосвязи «структура–свойство» с использованием дополнительных инструментальных методов для выяснения характера взаимодействия ЦСР с метиленовым синим и механизмов воздействия гелей на клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных исследований изучен процесс самоорганизации в ЦСР на стадии «созревания» при взаимодействии водных растворов нитрата серебра и аминокислоты L-цистеин. В начальный момент происходит образование молекул меркаптида серебра (МС) в результате замещения серебром водорода в тиольной группе L-цистеина. Затем при некотором превышении концентрации ионов серебра в смешанном растворе L-цистеин/ $\text{AgNO}_3=1,25$ происходит формирование супрамолекулярных цепей из молекул МС. Установлено, что для получения ЦСР необходим оптимальный температурный ($\sim 25-28^\circ\text{C}$) и временной интервал (3-5 ч.). Формирование супрамолекулярных цепей в процессе самоорганизации ЦСР подтверждается появлением и ростом интенсивности УФ полос поглощения 310 и 390 нм, характеризующих комплексы с переносом заряда. Повышение температуры существенно увеличивает скорость процесса самоорганизации и уменьшает время «созревания» ЦСР, что позволяет регулировать данный процесс. Изучение кинетики процесса самоорганизации показало, что энергия активации этого процесса составляет 90 кДж/моль, то есть близка к энергии донорно-акцепторного взаимодействия при образовании комплексов с переносом заряда. Также доказательством формирования супрамолекулярных цепей в процессе самоорганизации ЦСР служит уменьшение значения электропроводности с 1245 до 569 $\mu\text{См/см}$ до выхода на постоянное значение.

Установлено, что в процессе формирования пространственной сетки геля при введении в ЦСР электролитов (солей металлов) участвуют как катионы металла, так и анионы. Существует определенный концентрационный диапазон, в котором формируется гидрогель: для Na_2SO_4 – 1,15-1,45 мМ, для MnSO_4 – 0,85-1,75 мМ, для MgSO_4 – 1,7-3,1 мМ, для CoSO_4 – 0,8-1,2 мМ, для NiSO_4 – 0,8-1,1 мМ, а для CuSO_4 – 0,4-0,7 мМ. Похожая картина прослеживается и с хлоридами металлов. Следовательно, можно вывести закономерность между диаграммами прочности гидрогелей, образованных солями никеля, кобальта и меди: $\text{Cu}^{+2} \approx \text{Co}^{+2} = \text{Ni}^{+2}$.

Установлено соответствие между прочностными и вязкостными свойствами системы: по увеличению вязкостных свойств ($\text{AlCl}_3 \rightarrow \text{NaCl} \rightarrow \text{CuCl}_2$) и по увеличению размера частиц в ходе процесса гелеобразования. Установлена зависимость увеличения вязкости в ряду исследуемых катионов: $\text{Na}^+ \rightarrow \text{Mg}^{+2} \rightarrow \text{Mn}^{+2} \rightarrow \text{Ni}^{+2} \rightarrow \text{Co}^{+2} \rightarrow \text{Cu}^{+2}$, следовательно, наибольшая вязкость раствора у CuCl_2 (9,5 отн.ед.), по сравнению с другими электролитами. Доказано изменение размеров кластеров при созревании ЦСР (~100 нм), их рост и образование пространственной гель-сетки при взаимодействии с инициаторами гелеобразования: гель с NaCl (150 нм), CuCl_2 (1300 нм) и AlCl_3 (650 нм). Гидрогели исследованы как биполярная заряженная система. Методами СЭМ и ПЭМ установлено, что на неоднородный характер образующейся гель-сетки влияет внесенный инициатор, заряд катиона и силы комплексообразующего металла. Установлено, что в процессе гелеобразования сульфат-анионы не вносят дополнительного разрушения в связи с тиольной группой в меркаптите (тиоляте) серебра по сравнению с Cl^- -анионами. Кроме того, появление полос в ИК спектре для Cl^- -аниона в области 770 и 910 см^{-1} , и отсутствие их у спектра гидрогеля с сульфат-анионом, говорит о разной природе воздействия Cl^- и SO_4^{2-} -аниона на процесс структурирования в ходе гелеобразования, что также подтверждается микрофотографиями, полученными ранее с помощью метода ПЭМ. Таким образом установлено, что Прочность геля зависит от комплексообразующей способности катионов металлов и их заряда.

Впервые зафиксировано образование стабильных гидрогелей с фторид-анионом, процесс самоорганизации протекает при концентрации фторид-анионов в диапазоне от 2,6 до 4,2 мМ. Вязкость гелей постепенно снижалась по мере увеличения концентрации анионов. Этот факт объясняется переходом от вытянутой структуры гель-сетки к сферическим частицам диаметром 0,1–2 мкм. Измерение дзета-потенциала и размеров образующихся частиц методом ДСР показывает, что часть агрегатов в процессе измерения остается в наноразмерном диапазоне, а их гидродинамический диаметр частиц равен ~255 нм.

По результатам исследований процесса гелеобразования в ЦСР при взаимодействии катионов и анионов электролита предложена модель формирования гель-сетки.

Впервые в работе исследована совместимость нитрата серебра и антиоксидантного трипептида глутатиона, в состав которого входит аминокислота L-цистеин. Показано, что в водном растворе глутатиона с избытком соли серебра в процессе самоорганизации можно получить систему со стабильными частицами и их упорядоченным распределением, что подтверждается методом УФ-спектроскопии, ДСР и измерением дзета-потенциала. Так, для выбранных стабильных соотношений в УФ-спектре образуется полоса поглощения 270 нм, характерная образованию связи S-Ag, а дзета-потенциал для данных систем равен +13,3 мВ – для соотношения 1:2 и +13,6 мВ – для 1:2.25 соответственно. В результате проведенных исследований установлено, что для данной системы существует определенный концентрационный диапазон, в котором образуются устойчивые ассоциаты. Можно заметить, что рН глутатиона равен 2,91, при добавлении нитрата серебра в системе происходит ступенчатое увеличение кислотности. Это объясняется взаимодействием ионов серебра с тиольной группой глутатиона, и в результате высвобождения протонов водорода. Положительные значения ξ -потенциала на границе скольжения свидетельствуют о положительном заряде адсорбционного слоя частиц-ассоциатов. Однако, значения ξ -потенциала в гидрогелях на основе ЦСР примерно в 6 раз выше. Следовательно, в дальнейших исследованиях самоорганизации с участием ионов-инициаторов возможного гелеобразования, следует добавлять в систему анионы с соответствующим невысоким отрицательным зарядом, т.к. на данном этапе получить гели при введении различных электролитов пока не удалось.

Проведенные исследования с гидрогелями, полученными с использованием различных электролитов, показывают разное влияние на рост раковых клеток. Проведены исследования со многими композициями гидрогелей на подавление роста раковых клеток. Установлен положительный эффект. Токсичность гелей для нормальных эмбриональных фибробластов была низкой только в случае образца с

минимальным содержанием фторид-анионов, сульфаты и нитраты меди и натрия проявляли низкую токсичность на кератиноциты человека. Однако, гели на основе ЦСР и F^- -аниона продемонстрировали более высокую противоопухолевую активность в отношении клеток SiHa по сравнению с исходным ЦСР и гелями на основе ЦСР и SO_4^{2-} -аниона. Гидрогели с Cu^{2+} наиболее эффективно подавляют рост раковых клеток (до 20%) без вреда здоровым клеткам (HaCat).

Впервые синтезированы новые супрамолекулярные фотоактивные гидрогели на основе гидрогеля ЦСР/ $CuSO_4$ и метиленового синего. Образование стабильных гелей происходит в диапазоне концентраций метиленового синего от $1,0 \cdot 10^{-3}$ до 1,0 мМ. Волокна гель-сетки утолщаются, а структура их поверхности меняется с морщинистой на гладкую только при максимальной концентрации метиленового синего. Установлено, что молекулы метиленового синего взаимодействуют с поверхностью наночастиц цистеин-серебряного гидрогеля, не влияя при этом на стабильность самого гидрогеля или подавление активности красителя. Полученные «фотогели» продемонстрировали эффект подавления плоскоклеточной карциномы при низкой токсичности для кератиноцитов (здоровых клеток) как в отсутствие облучения, так и в ходе фотодинамической терапии. Получаемые гидрогели воздействуют на раковые клетки даже без светового облучения. Таким образом, установлена совместимость гидрогеля с метиленовым синим, что позволяет использовать исследуемый гидрогель в качестве матрицы-переносчика для адресной доставки лекарственных препаратов.

ВЫВОДЫ:

1. Установлены оптимальные условия для протекания процесса самоорганизации или «созревания» ЦСР: $C=1,00$ мМ, оптимальная температура 25-30°C. Сам процесс самоорганизации проходит в два этапа: на первом – быстрое образование молекул МС, на втором – процесс «созревания» ЦСР (формирование супрамолекулярных цепочек из молекул МС).

2. Построены кинетические зависимости, рассчитана кажущаяся энергия активации процесса самоорганизации в ЦСР $E_a=90,0 \pm 2,0$ кДж/моль,

свидетельствующая о донорно-акцепторном взаимодействии между молекулами МС при формировании супрамолекулярных цепей.

3. Определены концентрационные диапазоны для вводимых электролитов при образовании гелей. Представлена схема образования пространственной сетки геля при введении электролита в ЦСР в виде разветвленных супрамолекулярных цепей, соединенных донорно-акцепторной связью. Катионы металла в гель-сетке взаимодействуют в соответствии с проявляемой силой комплексообразования с карбоксильной группой МС в супрамолекулярной цепи, а встраивание аниона в структуру гель-сетки происходит посредством взаимодействия с аминогруппой. Установлено образование стабильных гидрогелей с F^- -анионом в диапазоне концентраций от 2,6 до 4,2 мМ. Получен тиксотропный трехкомпонентный гидрогель на основе гидрогеля ЦСР/ $CuSO_4$ и метиленового синего.

4. Исследован процесс самоорганизации в водном растворе глутатиона и нитрата серебра. Определены оптимальные соотношения концентрации исходных компонентов $GSH/AgNO_3$ (1:2,00 и 1:2,25) для получения прозрачных устойчивых растворов в результате процесса самоорганизации. Представлена схема взаимодействия иона серебра с молекулой глутатиона в результате замещения иона водорода в тиольной и карбоксильной группе.

5. Исследована цитотоксичность полученных гидрогелей. Наибольшую активность в подавлении роста раковых клеток карциномы молочной железы (MCF-7) показали гидрогели с катионом меди. Гели с F^- -анионом продемонстрировали более высокую противоопухолевую активность в отношении клеток SiHa по сравнению с исходным ЦСР и гелями с SO_4^{2-} -анионом. Установлена совместимость гидрогеля с метиленовым синим, и доказано проявление противоопухолевой активности данного образца.

Список литературы

1. Mubashar, Ilyas Supramolecular hydrogels: A versatile and sustainable platform for emerging energy materials / Ilyas Mubashar, Imran Sabahat, Ahmad Khan Maroof et al // J. of Molecular Liquids. –2024. –V.401. –P.124629.
2. Esposito, C.L. Organogels, promising drug delivery systems: an update of state-of-the-art and recent applications / C.L. Esposito, P. Kirilov, V.G. Roullin // J. Controlled Release. –2018. –V.271. –P.1–20.
3. Puşcaş, A. Oleogels in Food: A Review of Current and Potential Applications / A. Puşcaş, V. Mureşan, C. Socaciu, S. Muste // Foods Basel Switz. –2020. –V.9. –P.1–27.
4. Jayakumar, A. Hydrogels for Medical and Environmental Applications / A. Jayakumar, V.K. Jose, J.-M. Lee // Small Methods. –2020. –V.4. –P.1900735.
5. Vigata, M. Hydrogels as Drug Delivery Systems: A Review of Current Characterization and Evaluation Techniques / M. Vigata, C. Meinert, D.W. Hutmacher, N. Bock // Pharmaceutics. –2020. –V.12. –P.1188.
6. Carayon, I. Electro-responsive hydrogels: macromolecular and supramolecular approaches in the biomedical field / I. Carayon, A. Gaubert, Y. Mousli, B. Philippe // Biomater. Sci., –2020. –V.8. –P.5589-5600.
7. Пахомов П.М., Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Комаров П.В. Супрамолекулярные гели (монография). Тверь: Тверской гос. ун-т. 2011. 272 с.
8. Спиридонова В. М. Супрамолекулярные гидрогели на основе L-цистеина и нитрата серебра: получение, структура и физикохимические свойства: дис. к.х.н: 02.00.04: защищена 14.06.12 / Спиридонова Валентина Михайловна. 2012. Тверь. 120 с.
9. Перезовова Т.В. Супрамолекулярные системы на основе водных растворов L-цистеина, его производных и солей серебра: дис. к.х.н: 1.4.4: защищена 29.02.24 / Перезовова Татьяна Викторовна. 2024. Тверь. 160 с.
10. Yong, Liu Silver(I)–glutathione biocoordination polymer hydrogel: effective antibacterial activity and improved cytocompatibility / Liu Yong, Ma Wanshun, Liu Wenwen et al // J. Mater. Chem. – 2011. –V. 21. – P.19214.
11. Pradip, Kumar Sukul Supramolecular hydrogels of adenine: morphological, structural and rheological investigations / Kumar Sukul Pradip, Malik Sudip // Soft Matter. –2011. – V.7. – P.4234.
12. Блажитко, Е.М. Серебро в медицине / Е.М. Блажитко, В.А. Бурмистров, А.П. Колесников, Ю.И. Михайлов, П.П. Родионов // Новосибирск: НаукаЦентр. – 2004. – 254 с.
13. Weisbecker, C.S., Molecular self-assembly of aliphatic thiols on gold colloids / C.S. Weisbecker, M.V. Merritt, G.M. Whitesides // Langmuir. –2008. –V. 12. –N.16. – P. 3763-3772.
14. Hoque, J Stimuli-Responsive Supramolecular Hydrogels and Their Applications in Regenerative Medicine / J. Hoque, N. Sangaj, S. Varghese // Macromol. Biosci. – 2019. –V.19. –P.1800259.

15. Baranova, O.A. Medical hydrogels based on bioactive compounds. Synthesis, properties, and possible application for preparing bactericidal materials / O. A. Baranova, N. I. Kuz'min, T. I. Samsonova, I. S. Rebetskaya, O. P. Petrova, P. M. Pakhomov, S. D. Khizhnyak, P. V. Komarov, and M. M. Ovchinnikov // *Fibre Chemistry*. – 2011. – V. 43. – N. 1.
16. Liangchun, Li Anions-responsive supramolecular gels: A review / Liangchun Li, Rongqin Sun, Renlin Zheng, Yi Huang // *Materials & Design*. – 2021. – V. 205. – P. 109759-109779.
17. Jiuyang, Zhang Anion-Responsive Metallopolymer Hydrogels for Healthcare Applications / Zhang Jiuyang, Jing Yan, Pageni Parasmani // *Scientific Reports*. – 2015. – V.5. – P.11914.
18. Lehn J.-M. *Supramolecular Chemistry, Concepts and Perspectives*. Weinheim, 1995. Русский перевод: Лен, Жан-Мари. *Супрамолекулярная химия: Концепции и перспективы* / Жан-Мари Лен; Пер. с англ. канд. хим. наук Е. В. Болдыревой под ред. чл.-кор. РАН В. В. Власова, канд. хим. наук А. А. Варнека. // Новосибирск: Наука. Сиб. предприятие РАН. – 1998. – 333 с.
19. Короткова, А.В. Супрамолекулярная химия как одно из перспективных направлений развития химической науки / Короткова А.В., Плужник О.М., Потемкина Н.М. // *Успехи современной науки и образования*. – 2017. – Вып.6. – Т.2. – С.109-117.
20. Сид Д. В., Этвуд Д. Л. *Супрамолекулярная химия*. В двух томах. — Москва, Академкнига. – 2007. – Т. 1. – 480 с. – Т. 2. – 416 с.
21. Jayawickramarajah, J. *Supramolecular Medicinal Chemistry and Chemical Biology* / J. Jayawickramarajah, A.J. Wilson // in *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*. – 2017. – V.5. – N. 1.
22. Фам Тхи Лан. Комплексообразование триглицина с эфиром 18-краун-6 и ионом меди (II) в водно-органических растворителях: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.01, 02.00.04 / Фам Тхи Лан. — Иваново. – 2014. — 131 с.
23. D.F. Shriver, P.W. Atkins, T.L. Overton, J.P. Rourke, M.T. Weller, F.A. Armstrong // *Inorganic Chemistry*. 4th Edition. OUP Oxford. – 2006. – 848 p.
24. Ehrlich P. / *Collected Studies on Immunity* // *Studies on Immunity*. Wiley & sons. N.Y.. – 1906. – 586 p.
25. Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* – 1894. – V.27. – P.2985-2993.
26. Werner, A. // *Zeitschr. Anorg. Chem.* – V.3. – 1893. – 267 p.
27. Зоркий, П.М. Супрамолекулярная химия: возникновение, развитие, перспективы / П.М. Зоркий, И.Е. Лубнина // *Вестн. Моск. Ун-та. – Сер.2. Химия*. – 1999. – Т.40. – № 5. – С. 300—307.
28. Фенелонов В.Б. Введение в физическую химию формирования супрамолекулярной структуры адсорбентов и катализаторов / В.Б. Фенелонов; Отв. ред. акад. В.Н. Пармон, Рос. акад. наук. Сиб. отд-ние, Ин-т катализа им. Г.К. Борескова. — 2-е изд., испр. и доп. — Новосибирск: Изд-во СО РАН. – 2002. — 414 с. – 2004. — 440 с. ил.; 25.

29. Химическая энциклопедия / Редкол.: Кнунянц И.Л. и др. — М.: Советская энциклопедия. —1990. — Т. 2 (Даф-Мед). — 671 с.
30. Gutsche, C.D. Calixarenes: Monographs in Supramolecular Chemistry, Stoddart, J.F., Ed., Cambridge: The Royal Society of Chemistry. — 1989. —V. 1. — P. 1.
31. Словарь нанотехнологических и связанных с нанотехнологиями терминов, под ред. С. В. Калюжного, — М.: Физматлит. — 2010. — 528 с.
32. Дядин, Ю.А. Супрамолекулярная химия: контактная стабилизация молекул // Структура и реакционная способность веществ. СОЖ. Химия. — 1998. —№2.— С. 79-88.
33. Feihe, Huang Anslyn Introduction: Supramolecular Chemistry / Huang Feihe, V. Eric // Chem. Rev. —2015. —V. 115. —Issue 15. — P. 6999-7000.
34. Lehn, J.-M. Spontaneous assembly of double-stranded helicates from oligobipyridine ligands and copper(I) cations: structure of an inorganic double helix / J.-M. Lehn, A. Rigault, J. Siegel et al // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. —1987. —V.84. —P. 2565.
35. Пожарский А. Ф. Супрамолекулярная химия. Часть 2. Самоорганизующиеся молекулы. Соросовский образовательный журнал. —1997. —Т. 9. —с. 40–47.
36. Samuel, I. Stupp Supramolecular Chemistry and Self-Assembly in Organic Materials Design / I. Stupp Samuel, C. Palmer Liam // Chemistry of Materials. — 2013. —V.26. —Issue 1.—P.507-518.
37. Баранова О.А. Физико-химические аспекты самоорганизации супрамолекулярной системы на основе водного раствора L-цистеина и нитрата серебра: дис. к.х.н.: 02.00.04: защищена 19.12.2013 / Баранова Ольга Александровна. 2013.
38. Адамян А.Н. Процессы самоорганизации в водных растворах L-цистеина с участием солей серебра, водорастворимых полимеров и под воздействием облучения: дис. к.х.н.: 1.4.4: защищена 12.10.2023 / Адамян Анна Нориковна. 2023. 150 с.
39. Baburkin, P.O. Simulation of Gelation Process in Cysteine–Silver Solution by Dissipative Particle Dynamics Method / P.O. Baburkin, P.V. Komarov, S.D. Khizhnyak, P.M. Pakhomov // Colloid Journal. —2015. — V. 77. — N. 5. — P. 561–570.
40. Khizhnyak, S.D. Mechanism of Gelation in Low-Concentration Aqueous Solutions of Silver Nitrate with L-Cysteine and Its Derivatives / S.D. Khizhnyak, P.V. Komarov, M.M. Ovchinnikov, L.V. Zherenkova and P.M. Pakhomov // Soft Matter. —2017. —V.30. —N.13. —P.5168-5184.
41. Baburkin, P. O. Computer Simulation of Structuring in Aqueous L-Cysteine–Silver-Nitrate Solutions under the Action of Initiating Salt / P. O. Baburkin, P. V. Komarov, M. D. Malyshev, S. D. Khizhnyak, and P. M. Pakhomov. // Colloid Journal. — 2017. — V. 79. — No. 5. — P. 577–587.
42. Malyshev, M. D. Molecular dynamics simulation of the aging process of the cysteine-silver solution / M. D. Malyshev, P. O. Baburkin, A. N. Adamyan, S. D. Khizhnyak, P. M. Pakhomov, and P. V. Komarov // Journal of Structural Chemistry. —2019. —V. 60. — No. 8. —P. 1344-1351.

43. Malyshev, M.D. Self-assembly in systems based on L-cysteine–silver-nitrate aqueous solution: multiscale computer simulation / M.D. Malyshev, S.D. Khizhnyak, L.V. Zherenkova, P.M. Pakhomov, P.V. Komarov. // *Soft Matter*. – 2022. –V.18. –P.7524-7536.
44. Большая советская энциклопедия, изд.1, т.41, с.377.
45. Воюцкий С. С. Курс коллоидной химии. — М., 1975. — 481 с.; Папков С.П. Студнеобразное состояние полимеров. — М., 1974.
46. Huijun, Li Review of 3D printable hydrogels and constructs / Huijun Li, Cavin Tan, Lin Li // *Materials & Design*. –2018. –V.159. –P.1–67.
47. Jones, C.D. Gels with sense: supramolecular materials that respond to heat, light and sound / C.D. Jones, J.W. Steed // *Chem. Soc. Rev.* –2016. –V.45. –P.6546–6596.
48. Preman, N.K.Recent developments in stimuli-responsive polymer nanogels for drug delivery and diagnostics: A review / N.K. Preman, R.R. Barki, A. Vijayan, S.G. Sanjeeva, R.P. Johnson// *Eur. J. Pharm. Biopharm.* –2020. –V.157. –P. 121–153.
49. Hoque, J. Stimuli-Responsive Supramolecular Hydrogels and Their Applications in Regenerative Medicine / J. Hoque, N. Sangaj, S. Varghese // *Macromol. Biosci.* –2019. –V.19. –P. 1800259.
50. Falcone, N. Supramolecular Assembly of Peptide and Metallopeptide Gelators and Their Stimuli-Responsive Properties in Biomedical Applications / N. Falcone, H.-B. Kraatz // *Chem.- Eur. J.* –2018. –V.24. –P.14316–14328.
51. Eelkema, R. Supramolecular or Macromolecular: What Is Best for Functional Hydrogels with Advanced Properties? / R. Eelkema, A. Pich Pros // *Adv. Mater.* – 2020. –V.32. –P. 1906012.
52. Li, Y.Fluorescent gels: a review of synthesis, properties, applications and challenges / Y. Li, D.J. Young, X.J. Loh // *Mater. Chem. Front.* –2019. –V.3. –P. 1489–1502.
53. Nakao, S.I. Characteristics of macromolecular gel layer formed on ultrafiltration tubular membrane / S.I. Nakao, T. Nomura, S. Kimura // *AIChE J.* –1979. –V.25. –P. 615–622.
54. Liu, M. Supramolecular gelatons: towards the design of molecular gels / M. Liu, G. Ouyang, D. Niu, Y. Sang // *Org. Chem. Front.* –2018. –V.5. –P. 2885–2900.
55. Fang, W. Recent Advances in Supramolecular Gels and Catalysis / W. Fang, Y. Zhang, J. Wu, C. Liu, H. Zhu, T. Tu // *Chem.- Asian J.* –2018. –V.13. –P.712–729.
56. Du, X. Supramolecular Hydrogelators and Hydrogels: From Soft Matter to Molecular Biomaterials / X. Du, J. Zhou, J. Shi, B. Xu // *Chem. Rev.* –2015. – V.115. –P.13165 13307.
57. Karoyo, A.H. Physicochemical Properties and the Gelation Process of Supramolecular Hydrogels: A Review / A.H. Karoyo, L.D. Wilson // *Gels*. – 2017. –V.3. –N.1.
58. Bai, B.A comprehensive review of polyacrylamide polymer gels for conformance control / B. Bai, J. Zhou, M. Yin // *Pet. Explor. Dev.* –2015. –V.42. –P.525–532.

59. Cavallaro, G. Pickering Emulsion Gels Based on Halloysite Nanotubes and Ionic Biopolymers: Properties and Cleaning Action on Marble Surface / G. Cavallaro, S. Milioto, L. Nigamatzyanova et al // ACS Appl. Nano Mater. –2019. –V.2. –P. 3169–3176.
60. Noro, A. Design and properties of supramolecular polymer gels / A. Noro, M. Hayashi, Y. Matsushita // Soft Matter. –2012. –V.8. –P. 6416–6429.
61. Mao, Q. Self-contracting oxidized starch/gelatin hydrogel for noninvasive wound closure and wound healing / Q. Mao, O. Hoffmann, K. Yu et al // Mater. & Des. –2020. –V.194. –P.108916.
62. Cavallaro, G. Chitosan-based smart hybrid materials: a physico-chemical perspective / G. Cavallaro, S. Micciulla, L. Chiappisi, G. Lazzara // J. Mater. Chem. –2021. –B. 9. –P. 594–611.
63. Stupp, S. I. Self-Assembly and Biomaterials / S. I. Stupp // Nano Lett. –2010. –V.10. –N.12. –P.4783–4786.
64. Kumar, V.A. Stimuli-Responsive Supramolecular Hydrogels and Their Applications in Regenerative Medicine / V.A. Kumar, B. K. Wang, S. M. Kanahara // Macromol. Biosci. –2018. –V. 241. –P.899.
65. Goor, O. J. G. M. From supramolecular polymers to multi-component biomaterials / O. J. G. M. Goor, S. I. S. Hendrikse, P. Y. W. Dankers, E. W. Meijer // Chem. Soc. Rev. –2017. –V. 46. – Issue 21. –P.6621.
66. Huang, G. Functional and biomimetic materials for engineering of the three-dimensional cell microenvironment / G. Huang, F. Li, X. Zhao, Y. Ma, Y. Li, M. Lin, G. Jin, T. J. Lu, G. M. Genin, F. Xu // Chem. Rev. –2017. –V.117. –P.12764–12850.
67. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications / A. S. Hoffman // Adv. Drug Delivery Rev. –2012. –V. 64. –P. 18.
68. Koetting, M. C. Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications / M.C. Koetting, J.T. Peters, S.D. Steichen, N.A. Peppas // Mater. Sci. Eng. R Rep. –2015. –V.93. –P.1-49.
69. Lim, H. L. Varghese Smart hydrogels as functional biomimetic systems / H.L. Lim, Y. Hwang, M. Kar // Biomater. Sci. –2014. –V.2. –P.603-618.
70. Tsitsilianis, C. Responsive reversible hydrogels from associative “smart” macromolecules / C. Tsitsilianis // Soft Matt. –2010. –V.6. –P.2372-2388.
71. Lin, C. C. Recent advances in crosslinking chemistry of biomimetic poly (ethylene glycol) hydrogels / C. C. Lin // RSC Adv. –2015. –V. 5. –P. 39844-39853.
72. Appel, E. A. Supramolecular polymeric hydrogels / E. A. Appel, J. del Barrio, X. J. Loh, O. A. Scherman // Chem. Soc. Rev. –2012. –V. 41. –P. 6195-6214.
73. Liow, S. S. Thermogels: In Situ Gelling Biomaterial / S. S. Liow, Q. Dou, D. Kai, et al // ACS Biomater. Sci. Eng. –2016. –V.2. – N.3. –P. 295-316.
74. Liow, S. Biodegradable thermogelling polymers for biomedical applications / S. Liow, A. A. Karim, X. J. Loh // MRS Bull. –2016. –V. 41. –P. 557-566.
75. Tamai, Y. Molecular Simulation of Permeation of Small Penetrants through Membranes. 2. Solubilities / Y. Tamai, H. Tanaka, K. Nakanishi // Macromolecules. –1995. –V. 28. –N.7. –P. 2544-2554.

76. Kawai, Yusaku Effects of the Hydration States of Water Molecules on the Mechanical Properties of Dual Movable Cross-Linked Polymeric Gels / Yusaku Kawai, Junsu Park, Ryuhei Motokawa, et al. // *CS Appl. Polym. Mater.* –2025. –V.7. –N.12. –P. 7767–7776.
77. Du, X. Supramolecular Hydrogelators and Hydrogels: From Soft Matter to Molecular Biomaterials / X. Du, J. Zhou, J. Shi, B. Xu // *Chem. Rev.* –2015. –V. 115. –N.24. –P. 13165–13307.
78. Christoff-Tempesta, T. Beyond Covalent Crosslinks: Applications of Supramolecular Gels / T. Christoff-Tempesta, A.J. Lew, J.H. Ortony// *Gels.* –2018. –V. 4. –P. 40.
79. Hu, B. Supramolecular hydrogels for antimicrobial therapy / B. Hu, C. Owh, P.L. Chee et al // *Chem. Soc. Rev.* –2018. –V.47. –P.6917–6929.
80. Li, L. Tunable morphology and functionality of multicomponent self-assembly: a review / L. Li, R. Sun, R. Zheng // *Mater. Des.* –2021. –V.197. –P.109209.
81. Weiss, R.G. The Past, Present, and Future of Molecular Gels. What Is the Status of the Field, and Where Is It Going? / R.G. Weiss // *J. Am. Chem. Soc.* –2014. –V.136. –P. 7519–7530.
82. Draper, E.R. Low-Molecular-Weight Gels: The State of the Art / E.R. Draper, D.J. Adams // *Chem.* –2017. –V.3. –P. 390–410.
83. Mahinroosta, M. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications / M. Mahinroosta, Z. Jomeh Farsangi, A. Allahverdi, Z. Shakoory // *Mater. Today Chem.* –2018. –V.8. –P. 42–55.
84. Chen, J. Cyclic c Peptides With Transmembrane Water Channel Properties / J. Chen, Q. Li, P. Wu et al // *Front. Chem.* –2020. –V.8. –P. 368.
85. Krieg, E. Supramolecular Polymers in Aqueous Media / E. Krieg, M.M.C. Bastings, P. Besenius, B. Rybtchinski // *Chem. Rev.* –2016. –V. 116. –N. 4. –P. 2414–2477.
86. Mann, J.L. Supramolecular polymeric biomaterials / J.L. Mann, A.C. Yu, G. Agmon, E.A. Appel // *Biomater. Sci.* –2018. –V.6. –P. 10-37.
87. Beatriu, E. Functional Molecular Gels / E. Beatriu, M. Juan F // *Royal Society of Chemistry, Cambridge.* – 2013.
88. Sangeetha, N.M. Supramolecular gels: Functions and uses / N.M. Sangeetha, U. Maitra // *Chem. Soc. Rev.* –2005. –V.34. –P.821–836.
89. Piepenbrock, M.-O.M. Metal- and Anion Binding Supramolecular Gels / M.-O.M. Piepenbrock, G.O. Lloyd, N. Clarke, J.W. Steed // *Chem. Rev.* –2010. –V.110. –P. 1960–200.
90. Savyasachi, A.J. Supramolecular Chemistry: A Toolkit for Soft Functional Materials and Organic Particles / A.J. Savyasachi, O. Kotova, S. Shanmugaraju, et al // *Chem.* –2017. –V.3. –P. 764–811.
91. Raeburn, J. The importance of the self-assembly process to control mechanical properties of low molecular weight hydrogels / J. Raeburn, A. Zamith Cardoso, D. J. Adams // *Chem. Soc. Rev.* –2013. –V.42. –N.12. –P. 5143-5156.
92. Pinteala, M. Smart Supra- and Macro-Molecular Tools for Biomedical Applications / M. Pinteala, M.J.M. Abadie, R.D. Rusu // *Materials.* –2020. –V.13. –P. 3343.

93. Echeverria, C. Functional Stimuli-Responsive Gels: Hydrogels and Microgels / C. Echeverria, S.N. Fernandes, M.H. Godinho, J.P. Borges, P.I.P. Soares // *Gels*. – 2018. –V. 4. –P. 54.
94. Xian, S. Temperature-responsive supramolecular hydrogels / S. Xian, M.J. Webber // *J. Mater. Chem. B*. –2020. –V.8. –P.9197–9211.
95. Zhu, M. Polysaccharide-based fast self-healing ion gel based on acylhydrazone and metal coordination bonds / M. Zhu, H. Jin, T. Shao, Y. Li, J. Liu, L. Gan, M. Long // *Mater. Des.*. –2020. –V.192. –P.108723.
96. Janarthanan, G. Exploring the potential of supramolecular hydrogels as advanced bioinks for bioprinting and biomedical applications / Janarthanan, S. Kokkattunivarthil Uthaman, K. Murugesh, S. Vijayavenkataraman // *IJB*. –2024. –V.10. –N.3. –P. 3223.
97. Cheng, Tzu-Yun Self-assembling functionalized nanopeptides for immediate hemostasis and accelerative liver tissue regeneration / Tzu-Yun Cheng, Hsi-Chin Wu, Ming-Yuan Huang, Wen-Han Chang, Chao-Hsiung Lee, Tzu-Wei Wang // *Nanoscale*. – 2013. –V.5. –P. 2734-2744.
98. Hoque, J. Stimuli-Responsive Supramolecular Hydrogels and Their Applications in Regenerative Medicine / J. Hoque, N. Sangaj, S. Varghese // *Macromol Biosci*. –2018. –V.19. –N.1.
99. Saha, E. Electrocatalytic Oxygen Evolution in Acidic and Alkaline Media by a Multistimuli-Responsive Cobalt(II) Organogel / E. Saha, K. Karthick, S. Kundu, J. Mitra // *ACS Sustain. Chem. Eng.*. –2019. –V.7. –P.16094–16102.
100. Salzano de Luna, M. Light-responsive and self-healing behavior of azobenzene-based supramolecular hydrogels / M. Salzano de Luna, V. Marturano, M. Manganelli et al // *J. Colloid Interf. Sci.*. –2020. –V.568. –P.16–24.
101. Mondal, S. A review on recent advances in polymer and peptide hydrogels / Mondal, S. Das, A.K. Nandi // *Soft Matter*. –2020. –V.16. –P.1404–1454.
102. Raza, R. Diaminomaleonitrile-functionalized gelators in F /CN sensing, phase-selective gelation, oil spill recovery and dye removal from water / R. Raza, A. Panja, K. Ghosh // *New J. Chem.*. –2020. –V.44. –P. 10275–1028.
103. Yadav, N. Short to ultrashort peptide-based hydrogels as a platform for biomedical applications / N. Yadav, M.K. Chauhan, V.S. Chauhan // *Biomater. Sci.*. –2020. –V.8. –P. 84–100.
104. Tovar, J.D. Supramolecular Construction of Optoelectronic Biomaterials / J.D. Tovar // *Acc. Chem. Res.*. –2013. –V.46. –P. 1527–1537.
105. Yan, X. Advances in the Application of Supramolecular Hydrogels for Stem Cell Delivery and Cartilage Tissue Engineering / X. Yan, Y.-R. Chen, Y.-F. Song, et al // *Front. Bioeng. Biotechnol.*. –2020. –V.8. –P.847.
106. He, T. A spontaneously formed and self-adjuvanted hydrogel vaccine triggers strong immune responses / T. He, X. Liang, L. Li, et al // *Mater. Des.*. –2021. –V.197. –P.109232.
107. Wezenberg, S.J. Reversible gel-sol photoswitching with an overcrowded alkene-based bis-urea supergelator / S.J. Wezenberg, C.M. Croisetu, M.C.A. Stuart, B.L. Feringa // *Chem. Sci.*. –2016. –V.7. –P. 4341–4346.

108. Zeng, L.A Highly Stretchable, Tough, Fast Self-Healing Hydrogel Based on Peptide-Metal Ion Coordination / L. Zeng, M. Song, J. Gu, Z. Xu, B. Xue, Y. Li, Y. Cao // *Biomimetics*. –2019. –V.4. –P.36.
109. Cai, L. Polypeptide-based self-healing hydrogels: Design and biomedical applications / L. Cai, S. Liu, J. Guo, Y.-G. Jia // *Acta Biomater.* –2020. –V.113. –P. 84–100.
110. Okesola, B.O. Applying low-molecular weight supramolecular gelators in an environmental setting— self-assembled gels as smart materials for pollutant removal / B.O. Okesola, D.K. Smith // *Chem. Soc. Rev.* –2016. –V.45. –P. 4226–4251.
111. Salzano de Luna, M. Light-responsive and self-healing behavior of azobenzene-based supramolecular hydrogels / M. Salzano de Luna, V. Marturano, M. Manganeli, C. Santillo, V. Ambrogio, G. Filippone, P. Cerruti // *J. Colloid Interf. Sci.* –2020. –V.568. –P. 16–24.
112. Zhang, Li Sustained intravitreal delivery of dexamethasone using an injectable and biodegradable thermogel / Li Zhang, W. Shen, J. Luan, D. Yang, G. Wei, L. Yu, W. Lu, J. Ding // *Biomaterials*. –2015. –V.23. –P.271-281.
113. Ji, Wei Photoresponsive Coumarin-Based Supramolecular Hydrogel for Controllable Dye Release / Wei Ji, Minggao Qin, Chuanliang Feng // *Macromol. Chem. and Phys.* – 2017. – V.219. – Issue 2. –P.398.
114. Соколов, П.М. Принципы и подходы к созданию флуоресцентных гидрогелей для диагностики онкологических заболеваний / П.М. Соколов, П.С. Самохвалов, Д.А. Баранова, А.В. Суханова // *Российский биотерапевт. журн.* – 2023. –Т.22. –Вып.4. –С.17-27.
115. Wallace, M. Magnetically Aligned Supramolecular Hydrogels / M. Wallace, A. Zamith Cardoso, W. J. Frith, J. A. Iggo, D. J. Adams // *Chem. Eur. J.* –2014. –V. 20. –P. 16484 – 16487.
116. Rowan, S.J. Anion Receptor Chemistry / S.J. Rowan, T. Aida, A.E. Rowan, J.L. Sessler, P. Gale, W.-S. Cho // *The Royal Society of Chemistry. Monographs in Supramolecular Chemistry*. – 2006. –V.8. – 404 p.
117. Zhang, K. Injectable, anti-inflammatory and conductive hydrogels based on graphene oxide and diacerein-terminated four-armed polyethylene glycol for spinal cord injury repair / K. Zhang, J. Li, J. Jin, et al // *Mater. Des.* –2020. –V.196. –P. 109092.
118. Lia, Liangchun Anions-responsive supramolecular gels: A review / Liangchun Lia, Rongqin Sunb, Renlin Zhenga, Yi Huang // *Materials and Design*. –2021. – V.205. –P.109759.
119. Купманс, К. Образование физических гидрогелей посредством взаимодействия «хозяин-гость» полимеров и сополимеров β -циклодекстрина с адамантильными группами / Купманс К.; Риттер Х. // *Macromolecules*. – 2008. –V. 41. –P.7416–7422.
120. Cook, Michael T. Polymers Exhibiting Lower Critical Solution Temperatures as a Route to Thermoreversible Gelators for Healthcare / Michael T. Cook, Peter Haddow, Stewart B. Kirton, William J. McAuley // *Advanced Functional Materials*. –2021. –V.31. –Issue 8. –P.2008123.

121. Zhu, M. Polysaccharide-based fast self-healing ion gel based on acylhydrazone and metal coordination bonds / M. Zhu, H. Jin, T. Shao, et al // *Mater. Des.* –2020. –V.192. –P.108723.
122. Xu, Feng Synthesis and properties of the metallo-supramolecular polymer hydrogel poly[methyl vinyl ether-alt-mono-sodium maleate]·AgNO₃: Ag⁺/Cu²⁺ ion exchange and effective antibacterial activity / Feng Xu, Harihara Padhy, Mona Al-Dossary et al // *Journal of Materials Chemistry B.* – 2014. – V. 37 – P. 6406–6411.
123. Xue, Peng Cation Tuning toward the Inference of the Gelation Behavior of Supramolecular Gels / Peng Xue, Huiqiong Wu, Xiaojuan Wang, et al // *Sci. Rep.* –2016. –V. 6. –P.25390-25396.
124. Luo, Zhongli Designer nanomaterials using chiral self-assembling peptide systems and their emerging benefit for society / Zhongli Luo, Shuguang Zhang // *Chem. Soc. Rev.* – 2012. –V.41. – Issue 13. –P. 4736-4754.
125. Sun, Z. Multistimuli-responsive, moldable supramolecular hydrogels cross-linked by ultrafast complexation of metal ions and biopolymers / Sun Z., Lv F., Cao L., Liu L., et al // *Angew. Chem. Int. Ed.* –2015. –V.54. –P. 944–7948.
126. Jin, Q. Amphiphilic schiff base organogels: metal-ion-mediated chiral twists and chiral recognition / Jin Q., Zhang L., Zhu X., Duan P. & Liu // *Chem. Eur. J.* – 2012. –V.18. –P. 4916–4922.
127. Irwansyah, I. Gram-positive antimicrobial activity of amino acid-based hydrogels / Irwansyah I., Li Y., Shi W., et al // *Adv. Mater.* –2015. –V.27. –P. 648–654.
128. Zhang, Z. In situ synthesis of Ag/amino acid biopolymer hydrogels as mouldable wound dressing / Zhang Z., He T., Yuan M., // *Chem. Commun.* –2015. –V.51. – P.15862–15865.
129. Saha, Ekata Purpose-built multicomponent supramolecular silver(I)-hydrogels as membrane-targeting broad-spectrum antibacterial agents against multidrug-resistant pathogens / Ekata Saha, Afruja Khan, Amirul I Mallick // *Journal of Materials Chemistry B.* –2024. –V.12. – N.5. –P.8767-8777.
130. Poirier, Alexandre Ca²⁺ and Ag⁺ orient low-molecular weight amphiphile self-assembly into “nano-fishnet” fibrillar hydrogels with unusual β -sheet-like raft domains Niki Baccile / Alexandre Poirier, Patrick Le Griel, Ingo Hoffmann, Javier Perez, Petra Pernot, Jérôme Fresnais // *Soft Matter.* –2023. –V.19. –Issue 3. – P.378-393.
131. Ilhami, F.B. Multi-Biofunctional Silver-Containing Metallosupramolecular Nanogels for Efficient Antibacterial Treatment and Selective Anticancer Therapy / F.B. Ilhami, S.Y. Huang, C.C. Cheng // *Acta Biomaterialia.* –2022. –V.151. – P.576-587.
132. Ramana, Eppa Venkata Reddy Ionically cross-linked pH-responsive hydrogel beads loaded with nickel cobaltite nanoparticles for controlled release of doxorubicin / Eppa Venkata Ramana, Guntakanti Ujwala, Thammineni Jithendra, Shaik Shahinshavali, Dandamudi Srilaxmi, Obireddy Sreekanth // *Colloid and Polymer Science.* –2025. –V.303. –P.1885-194.

133. Bakhtiari, K. Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Chitosan/Polyvinyl Alcohol Containing Zinc Oxide Nanoparticles as Hydrogel Wound Dressing / Bakhtiari, K., Kashanian, S., Mohamadinooripoor, R. et al. // *Fibers Polym.* – 2024. – V. 25. – P. 4199–4213.
134. Валиев, Т.М. Биологические эффекты супрамолекулярных гелей в отношении регенерации ран (обзор литературы) / Т.М. Валиев, М.Б. Петрова, Е.М. Мохов // *Верхневолжский медицинский журнал.* – 2019. – Т.18. – Вып.2.
135. Petrova, M.B. Reparative histogenesis of skin: reaction on the application of L-cysteine of argentum nitrate gel / M.B. Petrova, N.V. Pavlova, E.A. Kharitonova, N.V. Ilyashenko // *Open Journal of Regenerative Medicine.* – 2012. – V. 1. – N 3. – P. 25–28.
136. McCloskey, A.P. Self-assembling ultrashort NSAID-peptide nanosponges: multifunctional antimicrobial and anti-inflammatory materials / A.P. McCloskey, S.M. Gilmore, J. Zhou et al // *RSC Advances.* – 2016. – V.6. – Issue. 115. – P. 114738–114749.
137. Turibius, S. Facile synthesis of a biocompatible silver nanoparticle derived tripeptide supramolecular hydrogel for antibacterial wound dressings / S. Turibius et al. // *New Journal of Chemistry.* – 2016. – N. 3. – P. 2036–2043.
138. Kabir, S.R. Hyper-Mobile Water Is Induced around Actin Filaments / S.R. Kabir, K. Yokoyama, K. Mihashi, T. Kodama, M. Suzuki // *Biophys. J.* – 2003. – V.85. – P. 3154–3161.
139. Rahmati, N. Chloride Homeostasis in Neurons with Special Emphasis on the Olivocerebellar System: Differential Roles for Transporters and Channels / N. Rahmati, F.E. Hoebeek, S. Peter, C.I. De Zeeuw // *Front. Cell. Neurosci.* – 2018. – V. 12. – P. 10.
140. Wu, H. Metallogels: Availability, Applicability, and Advanceability / H. Wu, J. Zheng, A.-L. Kjøniksen, W. Wang, Y. Zhang, J. Ma // *Adv. Mater.* – 2019. – V. 31. – P. 1806204.
141. Piepenbrock, M.-O.M. Metal- and Anion-Binding Supramolecular Gels / M.-O.M. Piepenbrock, G.O. Lloyd, N. Clarke, J.W. Steed // *Chem. Rev.* – 2010. – V.110. – P. 1960–2004.
142. Pang, X. An “off-on” fluorescent naphthalimide-based sensor for anions: its application in visual F[–] and AcO[–] discrimination in a self-assembled gel state / X. Pang, J. Ge, X. Yu, et al // *New J. Chem.* – 2019. – V.43. – P. 10554–10559.
143. Bruice, P.Y. *Organic Chemistry* (eighth ed.). Pearson, Upper Saddle River, NJ. – 2016.
144. Maeda, H. Anion-Responsive Supramolecular Gels / H. Maeda // *Chem.- Eur. J.* – 2008. – V. 14. – P. 11274–11282.
145. Zeta potential - An introduction in 30 minutes. Technical note. Malvern.
146. Jayakumar, Anjali *Hydrogels for Medical and Environmental Applications* / Anjali Jayakumar, Vishal K. Jose, Jong-Min Lee // *Small Methods.* – 2020. – V.4. – Issue 3. – P.1900735.
147. Андрианова, Я.В. О процессе самоорганизации в водных цистеин-серебряных растворах под воздействием хлоридов металлов / Я.В.

- Андрианова, С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов // Вестн. Твер. гос. ун-та. Сер.: Химия. –2016. –№2. –С.99-107.
148. Andrianova, Ya.V. Gelation processes in an aqueous solution of L-cysteine/AgNO₃ under the influence of metal salts with various valencies / Ya.V. Andrianova, D.V. Vishnevetskii, A.I. Ivanova, S.D. Khizhnyak, and P.M. Pakhomov // Russ.Chem.Bull. – 2023. – V. 72. – N. 9. –P. 2171—2179.
 149. Pakhomov, P.M. Study of Gelation in Aqueous Solutions of Cysteine and Silver Nitrate / P.M. Pakhomov, S.D. Khizhnyak, M.V. Lavrienko, M.M. Ovchinnikov, W.Nierling, M.D. Lechner // Russ. Colloid J. –2004. –V. 66. –Issue.1. –P. 65.
 150. Pakhomov, P.M. A Supramolecular Medical Hydrogel Based on L-Cysteine and Silver Ions / P.M. Pakhomov, M.M. Ovchinnikov, S.D. Khizhnyak, O.A. Roshchina, P.V. Komarov // Polym. Sci. Ser. A. – 2011. –V. 53. –P. 820–826.
 151. Forman, Henry Jay Glutathione: Overview of its protective roles, measurement and biosynthesis / Henry Jay Forman, Hongqiao Zhang, Alessandra Rinna // Molecular Aspects of Medicine. –2009. –V.30. –P. 1–12.
 152. Meister, A. Biosynthesis and function of glutathione, an essential biofactor. / A. Meister // J. Nutrit. Sci. Vitaminol. –1992. –Spec No.1–6.
 153. Forman, H.J., Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes / H.J. Forman, M.J. Thomas // Annu. Rev. Physiol. – 1986. –V.48. –P.669–680.
 154. Vignais, P.V., The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism / P.V. Vignais // Cell Mol. Life Sci. –2002. –V.59. –N.9. –P.1428–1459.
 155. Bakkenist, A.R. The halide complexes of myeloperoxidase and the mechanism of the halogenation reactions / Bakkenist, A.R., de Boer, J.E., et al // Biochim. Biophys. Acta. – 1980. –V. 613. –N. 2. –P.337–348.
 156. Poli, G. The role of lipid peroxidation in liver damage / Poli, G., Albano, E., et al // Chem. Phys. Lipids. –1987. –V. 45. –N. 2–4. –P.117–142.
 157. Esterbauer, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes / Esterbauer, H., Schaur, R.J., et al // Free Radic. Biol. Med. – 1991. –V.11. –N.1. –P.81–128.
 158. Eckl, P.M. Genotoxicity of HNE / P.M. Eckl // Mol. Aspects Med. – 2003. –V.24. –N.4–5. –P.161–165.
 159. Schaur, R.J. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal / R.J. Schaur // Mol. Aspects Med. – 2003. –V.24. –N.4–5. –P.149–159.
 160. Meister, A. Glutathione metabolism and its selective modification / A. Meister // J. Biol. Chem. – 1988. –V.263. –P.17205–17208.
 161. Sutherland, M.W. Oxygen toxicity: loss of lung macrophage function without metabolite depletion / M.W. Sutherland, M. Glass et al // J. Free Radic. Biol. Med. – 1985. –V.1. –P.209-214.
 162. Cantin, A.M. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione / A.M. Cantin, S.L. North, et al // J. Appl. Physiol. – 1987. –V.63. –P.152–157.

163. Venglarik, C.J. Hypochlorous acid alters bronchial epithelial cell membrane properties and prevention by extracellular glutathione / C.J. Venglarik, J. Giron-Calle, et al // J. Appl. Physiol. – 2003. –V.95. –N.6. –P.2444–2452.
164. Roum, J.H. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis / Roum, J.H., Buhl, R., et al // J. Appl. Physiol. – 1993. –V.75. –P.2419–2424
165. Cantin, A.M. Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis / A.M. Cantin, R.C. Hubbard, et al // Am. Rev. Respir. Disease. – 1989. –V. 139. –P.370–372.
166. Biswas, S. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione / S. Biswas, I. Rahman, // Mol. Aspects Med. –2009. –V.30. –N.1–2. –P.60–76.
167. Yuan, L. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity / L. Yuan, N. Kaplowitz, // Mol. Aspects Med. – 2009. –V.30. –N.1–2. –P.29–41
168. Fraternate, A. GSH and analogs as antiviral drugs / A. Fraternate, A.F. Paoletti, et al // Mol. Aspects Med. – 2009. –V.30. –N.1–2. –P.99–110.
169. Huang, K.P. Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide / Huang, K.P., Huang, F.L. // Biochem. Pharmacol. – 2002. –V.64. –N.5–6. –P.1049–1056.
170. Forman, Henry Jay Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis / Henry Jay Forman, Hongqiao Zhang, Alessandra Rinna // Mol Aspects Med. –2008. –V.30. – N.1-2. –P.1–12.
171. Forman, H.J. Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction / Forman, H.J. // Free Radic. Biol. Med. – 2007. –V.42. –N.7. –P. 926–932.
172. Boyland, E. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis / E. Boyland, L.F. Chasseaud, // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. – 1969. –V.32. –P.173–219.
173. Huang, C.-S. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney g-glutamylcysteine synthetase / C.-S. Huang, L.-S. Chang, et al // J. Biol. Chem. – 1993. – V.268. – P.19675–19680.
174. Meister, A. Glutathione, metabolism and function via the gamma-glutamyl cycle / A. Meister // Life Sci. – 1974. –V.15. –N.2. –P.177–190.
175. Anderson, M.E. Direct evidence for inter-organ transport of glutathione and that the non-filtration renal mechanism for glutathione utilization involves g-glutamyl transpeptidase / M.E. Anderson, R.J. Bridges, et al // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1980. –V.96. –N.2. –P. 848–853.
176. Hirota, T. Characterization of dehydropeptidase I in the rat lung / T. Hirota, Y. Nishikawa, et al // Eur. J. Biochem. – 1986. –V.160. –N.3. –P.521–525.
177. Meister, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy / A. Meister // Pharm. Therapeut. – 1991. –V.51. –P.155–194.
178. Levy, E.J. Transport of glutathione diethyl ester into human cells / E.J. Levy, M.E. Anderson, et al // Proceedings National Academy of Sciences, USA. – 1993. –V.90. –P.9171-9175.

179. Thor, H. Metabolic activation and hepatotoxicity. Effect of cysteine, N-acetylcysteine, and methionine on glutathione biosynthesis and bromobenzene toxicity in isolated rat hepatocytes / H. Thor, P. Moldeus, et al // Arch. Biochem. Biophys. – 1979. –V.192. –N.2. –P.405–413.
180. Dickinson, D.A. Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate-cysteine ligase gene expression / D.A. Dickinson, K.E. Iles, et al // Faseb. J. – 2003. –V.17. –N.3. –P.473–475.
181. Brooks, J.D. Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane / J.D. Brooks, V.G. Paton, et al // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2001. –V.10. –N. 9. –P. 949–954.
182. Martensson, J. Glutathione metabolism in the lung: Inhibition of its synthesis leads to lamellar body and mitochondrial defects / J. Martensson, A. Jain, et al // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. –V. 86. –P.5296–5300.
183. Anderson, C.P. Buthionine sulfoximine alone and in combination with melphalan (L-PAM) is highly cytotoxic for human neuroblastoma cell lines / Anderson, C.P., Tsai, J., et al // Eur. J. Cancer. – 1997. –V. 33. –N.12. –P.2016–2019.
184. Gartenhaus, R.B. Arsenic trioxide cytotoxicity in steroid and chemotherapy-resistant myeloma cell lines: enhancement of apoptosis by manipulation of cellular redox state / R.B. Gartenhaus, S.N. Prachand, et al // Clin. Cancer Res. – 2002. –V.8. –N.2. –P.566–572.
185. Griffith, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine / O.W. Griffith, // Analytical Biochemistry. – 1980. –V.106. –N.1. –P.207–212.
186. Poster, D.S. Acivicin. An antitumor antibiotic / Poster, D.S., Bruno, S., et al // Cancer Clin. Trials. – 1981. –V.4. –N.3. –P. 327–330.
187. Elliott, W.L. 1985. In vivo inactivation of formylglycinamidine ribonucleotide synthetase in rat hepatoma / W.L. Elliott, G. Weber, // Biochem. Pharmacol. – 1985. –V.34. –N.2. –P. 243–248.
188. Silva, A.P. Effects of methylene blue-mediated photodynamic therapy on a mouse model of squamous cell carcinoma and normal skin / A.P. Silva, C.L. Neves, E.D.A. Silva and others // Photodiagnosis Photodyn. Ther. –2018. –V.23. –P. 154–164.
189. Xu, L. A combination of preoperative or intraoperative MB-PDT and surgery in the treatment of giant cutaneous squamous cell carcinoma with infection / Xu, L., X. Li, C. Zhao et al // Photodiagnosis Photodyn. Ther. – 2021. –V.36. –P. 102545.
190. Андрианова, Я.В. Исследование реологических свойств в водном растворе L-цистеина и нитрата серебра при введении некоторых электролитов / Я.В. Андрианова, С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов // Вестн. Твер. гос. ун-та. Сер.: Химия. –2014. –№2. –С.123-128.
191. Андрианова, Я.В. Исследование процессов гелеобразования в цистеин-серебряном растворе при добавлении сульфатов металлов / Я.В. Андрианова, Д.В. Вишневецкий, С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов // Вестн. Твер. гос. ун-та. Сер.: Химия. –2023. –№3(53). –С.21-29.

192. Андрианова, Я.В. Исследования влияния катионов металлов на процесс самоорганизации в цистеин-серебряном растворе / Я.В. Андрианова, Д.В. Вишневецкий, С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов // Вестн. Твер. гос. ун-та. Сер.: Химия. –2026. –№3(65). –С.16-25.
193. Vishnevetskii, D.V. Fluoride-Ion-Responsive Sol–Gel Transition in an L-Cysteine/AgNO₃ System: Self-Assembly Peculiarities and Anticancer Activity / D.V. Vishnevetskii, Y.V. Andrianova, E.E. Polyakova, A.I. Ivanova, A.R. Mekhtiev // Gels. –2024. –V.10. –N.5. –P.332.
194. Андрианова, Я.В. Исследование процессов самоорганизации в водном растворе глутатиона при взаимодействии с нитратом серебра / Я.В. Андрианова, А.А. Беляков, Д.В. Вишневецкий, П.М. Пахомов // Вестн. Твер. гос. ун-та. Сер.: Химия. –2025. –№ 1 (59). –С. 7-19.
195. Пахомов П.М., Хижняк С.Д., Андрианова Я.В. Физические методы исследования: уч. пособие – Тверь: Твер. гос. ун-т. – 2016. – 292 с.
196. Андрианова Я.В. Сравнение влияния различных электролитов на процесс гелеобразования в низкоконцентрированных водных растворах L-цистеина и нитрата серебра: дис...маг./ науч. рук. Пахомов П.М. – Тверь. – 2012. – 59 с.
197. Бондарева Г.М. Разработка электрофлотационного процесса извлечения поверхностно-активных веществ и моторных топлив из водных стоков: дис. к.х.н.: 05.17.03: защищена 2010 / Бондарева Галина Михайловна. 2010. Москва. 174 с.
198. Справочное руководство пользователя. Система для характеристики наночастиц: Malvern Zetasizer Nano. – 2007. –94 с.
199. Киреев В. А. Курс физической химии : учебник для вузов / В. А. Киреев. – Изд. 3-е, перераб. и доп. – Москва: Химия. – 1975. – 776 с.
200. Соколовский А.Е., Радион Е.В. Физико-химические методы анализа: Тексты лекций по дисциплине «Аналитическая химия и физико-химические методы анализа» для студентов химико-технологических специальностей заочной формы обучения. – Минск.: БГТУ. – 2007. – 128 с.
201. Полякова, Е.Э. Влияние концентрации дисперсной фазы на процесс самосборки систем на основе L-цистеина и нитрата серебра / Е.Э. Полякова, В.С. Будяцкий, А.А. Беляков, Е.С. Бурлаков, Я.В. Андрианова, Д.В. Вишневецкий // Вестн. Твер. гос. ун-та. Сер: Химия. – 2023. – №3(53). – С.35-41.
202. Андрианова, Я.В. Исследование кинетики процесса самоорганизации в цистеин-серебряном растворе / Я.В. Андрианова, С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов // Вестн. Твер. гос. ун-та. Сер.: Химия. –2026. –№3. –С. 7-15.
203. Савельева, В.С. О кинетике созревания цистеин-серебряного раствора / В.С. Савельева, Я.В. Андрианова, С.Д. Хижняк, М.М. Овчинников, П.М. Пахомов // Физико-химия полимеров: синтез, свойства и применение. – 2011. – № 17. – С.151-158
204. Андрианова, Я.В. Влияние времени созревания цистеин-серебряного раствора на реологические свойства гидрогелей / Я.В. Андрианова, С.Д.

- Хижняк, П.М. Пахомов // Вестн. Твер. гос. ун-та. Сер.: Химия. – 2018. – №4. С.201-207.
205. Андрианова, Я.В. Влияние различных биоактивных электролитов на процесс самоорганизации в водном цистеин-серебряном растворе / Я.В. Андрианова, С.Ю. Золотухина, С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия. – 2013. – №16. – С. 137-149
206. Vishnevetskii D.V. L-cysteine/silver nitrate/iodate anions system: peculiarities of supramolecular gel formation with and without visible-light exposure / D.V. Vishnevetskii, E.E. Polyakova, Ya.V. Andrianova, A.R. Mekhtiev, A.I. Ivanova, D.V. Averkin, V.G. Alekseev, A.V. Bykov, M.G. Sulman // Gels. – 2024. – V.10. – N.12. – P. 809.
207. Андрианова, Я.В. Процессы самоорганизации в водном растворе L-цистеина и нитрата серебра под действием некоторых электролитов / Я.В. Андрианова, С.Ю. Золотухина, Т.В. Перезовова, С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов // Физико-химия полимеров: синтез, свойства и применение. – 2014. – № 20. – С. 120-127
208. G. Socrates, Infrared Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts, Wiley, 2nd ed., London. – 1994. – 366 pp.
209. Potapenkova, T.V. Effect of dispersed phase concentration on gelation and formation of silver nanoparticles in aqueous solutions of L-cysteine and silver nitrite / T.V. Potapenkova, D.V. Vishnevetskii, A.I. Ivanova, S.D. Khizhnyak, P.M. Pakhomov // Russ. Chem. Bull. –2022. –V.71. –P. 2123–2129.
210. Лавриенко, М.В. Изучение комплексов альбумина с ионами тяжелых металлов / М.В. Лавриенко, Д.В. Дылев, С.Д. Хижняк, Г.Д. Подгорный, М.М. Овчинников, П.М. Пахомов // Сб. “Физико-химия полимеров”. Тверь. – 2002. –Т.8. –С.135-140.
211. Siegel, R.L.; Giaquinto, A.N.; Jemal, A. Cancer statistics. CA Cancer J. Clin. – 2024. –V.74. –P.12–49.
212. Vishnevetskii, D.V. Preparation of Composite Hydrogels Based on Cysteine–Silver Sol and Methylene Blue as Promising Systems for Anticancer Photodynamic Therapy / Vishnevetskii D.V., Metlin F.A., Andrianova Y.V., Polyakova E.E., Ivanova A.I., Averkin D.V., Mekhtiev A.R. // Gels. –2024. –V.10. –N.9. –P. 577.

Благодарности

Автор выражает благодарность за помощь в работе и научное руководство доктору химических наук, профессору Пахомову Павлу Михайловичу; зав. лаб. спектроскопии ЦКП ТвГУ к.х.н., доценту Хижняк Светлане Дмитриевне за предоставление приборной базы и помощь в получении результатов и их обсуждении;

зав. лаб. электронной микроскопии ЦКП ТвГУ к.ф.м.н., доценту Ивановой Александре Ивановне за проведение исследований морфологии и химического состава супрамолекулярных гелей;

специалисту ЦКП физического факультета МГУ, к.т.н., доценту Абрамчуку Сергею Савельевичу за проведение исследований структуры растворов и гелей на просвечивающем электронном микроскопе;

к.б.н., с.н.с. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) Мехтиеву Арифу Раминовичу за проведение микробиологических испытаний супрамолекулярных гелей,

а также сотрудникам кафедры физической химии ТвГУ за помощь в проведении и обсуждении полученных результатов.