

На правах рукописи



БЕЛЯЕВА АНАСТАСИЯ АЛЕКСАНДРОВНА
МУЛЬТИСТИМУЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ
ПОЛИ(N-ИЗОПРОПИЛАКРИЛАМИДА) ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ
СКАФФОЛДОВ И АКТИУАТОРОВ

1.4.7 – Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Черноголовка, 2025

Работа выполнена в Институте физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук (ИФАВ РАН).

Научный руководитель:

Морозова Софья Михайловна

кандидат химических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», ведущий научный сотрудник-заведующий лабораторией

Официальные оппоненты:

Чвалун Сергей Николаевич

доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, главный научный сотрудник

Уласевич Светлана Александровна

кандидат химических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»

Защита диссертации состоится «10» декабря 2025 г. в 10.30 ч. на заседании Диссертационного совета 24.1.108.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук (ФИЦ ПХФ и МХ РАН) по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, проспект Академика Семенова, д. 1, актовый зал корпуса общего назначения..

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФИЦ ПХФ и МХ РАН и на официальном сайте <https://icp-ras.ru/> по адресу https://icp-ras.ru/wp-content/uploads/DISS/Belyaeva/Disser_Belyaeva.pdf.

Автореферат разослан «_____» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор химических наук

Джардималиева Г.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Биосовместимые гидрогели, перспективные для 3D-печати и способные изменять свои свойства под воздействием внешних стимулов (температура, магнитное поле, pH и т. д.), представляют интерес для медицины в качестве имплантов и клеточных скаффолдов. Это становится актуальным, поскольку гидрогели по механическим свойствам схожи с биологическими тканями, что позволяет их использовать для различных задач биомедицины. Гидрогели на основе нанокристаллической целлюлозы (НКЦ) привлекают большой интерес из-за их биосовместимости, механической прочности, фибриллярной структуры, а также возможности модификации поверхности наночастиц. Введение в гидрогели веществ, реагирующих на стимулы, приводит к получению «умных» материалов, которые перспективны для культивации клеток, доставки лекарств и перевязок ран. Поли(N-изопропилакриламид) (ПНИПАМ) является одним из наиболее распространенных материалов, водные растворы которого обладают термочувствительностью, связанной с изменением молекулярной конформации «клубок-глобула» выше нижней критической температуры растворения.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы является получение стимул-чувствительных клеточных скаффолдов и актюаторов с использованием методов экструзионной 3D-печати на основе биосовместимых компонентов, а именно, нанокристаллической целлюлозы и поли(N-изопропилакриламида).

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Построение диаграмм состояния водной коллоидной системы ПНИПАМ / НКЦ при комнатной температуре (25 °C) и постоянной температуре человеческого тела (37 °C).

2. Определить диапазоны массовой концентрации компонентов ПНИПАМ / НКЦ в водной коллоидной системе и их соотношений для получения физического геля с заданными механическими свойствами.

3. Оптимизировать соотношение ПНИПАМ / НКЦ и общую массовую концентрацию компонентов, чтобы получить физический гель, подходящий для экструзионной 3D-печати.

4. Синтезировать модифицированную алкиновыми группами НКЦ и привить ПНИПАМ, полученный методом псевдоживой полимеризации с обратимой передачи цепи (ОПЦ) с молекулярной массой

40 кДа и узким молекулярно-массовым распределением.

5. Определить диапазон массовой концентрации водной коллоидной системы НКЦ-графт-ПНИПАМ для образования термочувствительного тиксотропного геля при 37 °С, изучить реологические свойства, подобрать необходимую концентрацию для имитации механики разных отделов серого вещества мозга.

6. Оптимизировать состав чернил для 3D-печати на основе термочувствительного ПНИПАМ и магниточувствительного смешанного оксида железа Fe_3O_4 , для реакции достижения нескольких стимулов (температура и постоянный магнит). Подобрать условия печати, УФ-полимеризации и концентрации компонентов.

7. Создать биосовместимый мультистимульный актюатор, способный имитировать движение растений за счет исходного рисунка (паттерна). Показать возможность получения различных форм (ролл, спираль, лепесток и захватчик) под действием температуры, а также возможность перемещать актюатор под действием магнитного поля.

Научная новизна работы. Впервые изучена фазовая диаграмма состояния водной коллоидной системы на основе НКЦ и ПНИПАМ при 25 °С и 37 °С. На основании полученных диаграмм выделены области золя, геля и осадка. Были выбраны составы, образующие гель как при 25 °С, так и при 37 °С, и изучены их реологические свойства в зависимости от состава и температуры. Продемонстрирована их тиксотропность и возможность использования в экструзионной 3D-печати. Полученный материал демонстрирует необходимые физические свойства для биологических применений. Впервые показана возможность использования водной коллоидной системы НКЦ с привитым ПНИПАМ (НКЦ-графт-ПНИПАМ) для имитации механики серого вещества головного мозга. Продемонстрирована вариабельность механических свойств, фибриллярности и биосовместимости с первичными клетками мозга (астроцитами коры головного мозга и эндотелием микрососудов головного мозга) в зависимости от массовой концентрации, а также возможность контролируемого высвобождения лекарственных средств. Впервые собран однослойный мультистимул-чувствительный актюатор, реагирующий одновременно на изменение температуры и на приложенное магнитное поле. Для этого было получено два вида чернил на основе ПНИПАМ и НКЦ: термо- и магниточувствительные. Полученный актюатор может имитировать различные виды движения растений, что может быть использовано в инвазивной хирургии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, полученные в ходе работы, могут использоваться в различных направлениях биомедицины, включая разработку клеточных гидрогелевых каркасов, моделей для изучения высвобождения лекарственных средств и создания актюаторов различных форм для использования в инвазивной микрохирургии.

Методология и методы исследования.

В работе использовались методики синтеза полимера полимеризацией с обратимой передачей цепи, модификация полимерных наночастиц, прививка полимера к наночастицам. Полученные соединения и материалы исследовались с помощью гель-проникающей хроматографии, динамического рассеяния света, УФ- и ИК-спектроскопии, сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии, элементного анализа, а также были проведены реологические исследования.

Совместимость материала с клеточными культурами исследовалась с помощью МТТ-теста, оценки цитотоксичности, апоптоза и пролиферации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. На основе физических взаимодействий водного раствора ПНИПАМ и водной коллоидной дисперсии НКЦ при вариации массовой концентрации от 8 масс. %, а также в соотношении компонентов от 0,5 до 2 получают термочувствительные фибриллярные гидрогели. Варьируя концентрации и соотношения, можно получить материалы с различными механическими и реологическими свойствами, использовать их в экструзионной 3D-печати и применять в биомедицине для создания платформ для выращивания клеток.

2. Показано, что коллоидная система с термочувствительным гелеобразованием на основе НКЦ, к которой привит ПНИПАМ, является жидкой при комнатной температуре (25 °C) и гелем при постоянной температуре человеческого тела (37 °C).

3. Полученная система проявляет нелинейные механические свойства, настраиваемый механический модуль в зависимости от массовой концентрации НКЦ-графт-ПНИПАМ. Такие характеристики можно настроить, чтобы имитировать механические свойства разных отделов головного мозга, поместив внутрь системы различные лекарственные препараты, можно добиться контролируемого высвобождения.

4. Благодаря биосовместимости с клетками эндотелия

микрососудов головного мозга и астроцитами коры головного мозга (первичными клетками мозга) гель перспективен для применения в качестве импланта участков мозга, удаленных хирургическим путем, а также для микрофлюидных моделей мозга на чипе, пригодных для эффективного скрининга кандидатов на лекарственные препараты и анализа проницаемости гематоэнцефалического барьера при патогенезе физиологических состояний.

5. Разработаны два типа чернил для экструзионной 3D-печати, из которых был изготовлен однослойный мягкий актюатор с заданным распределением чернил, который реагировал на температуру и магнитное поле. Термочувствительность чернил достигалась благодаря ПНИПАМ. Магнитные свойства чернил обусловлены наличием в составе биосовместимого магнетита Fe_3O_4 . Показана возможность получения различных форм (ролл, спираль, лепесток и захватчик), а также возможность перемещать актюатор под действием магнитного поля.

6. Мультистимульный актюатор, содержащий ПНИПАМ, при помещении в воду, нагретую до 40 °С, принимает запрограммированную за счет распределения компонентов форму и способен к перемещению за счет притяжения к постоянному магниту. Сочетание независимой реакции на стимулы и возможность программирования 3D-структуры актюатора делают его подходящим для производства медицинских устройств и инвазивных биомедицинских применений.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации.

Результаты всех экспериментов были получены с использованием современного оборудования и общепринятых биологических протоколов. Достоверность полученных результатов подтверждается представленными первичными данными. По теме диссертации опубликовано **15** работ, в том числе **3** статьи, индексируемые в Web of Science и Scopus, а также **12** тезисов докладов в сборниках конференций различного уровня.

Личный вклад автора. Автор принимал активное участие в поиске и анализе литературы по теме исследования. Совместно с научным руководителем к.х.н. Морозовой С.М. были сформулированы задачи исследования, разработаны методики проведения экспериментов. Результаты получены автором или при его непосредственном участии. Автором были выполнен синтез поли(N-изопропилакриламида) различной молекулярной массы и магнетита, модификация нанокристаллической целлюлозы, прививка полимера к наночастицам, построение фазовых

диаграмм от массовых концентраций, соотношений и температуры. Самостоятельно проведена съемка и обработка результатов реологических экспериментов, измерение размеров частиц методом динамического рассеяния света, а также анализ размеров частиц по изображениям сканирующей электронной и просвечивающей электронной микроскопии.

Нанотомография была выполнена к.т.н. Кирейновым А.В. (МГТУ им. Баумана). Исследование цитотоксичности веществ было выполнено к.х.н. Коржиковой-Влах Е.Г., Соломаха О.А. (ИВС РАН) и к.б.н. Нащекиной Ю.А. (ИЦ РАН). Исследование релиза лекарственного средства было выполнено к.х.н. Коржиковым-Влах В.А. (СПбГУ Институт Химии). Выделение, культивирование и эксперименты на первичных клетках серого вещества мозга мышей было выполнено к.б.н. Александровой О.П., к.б.н. Аверчуком А.С. (Российский центр неврологии и нейронаук). Измерение магнитных свойств, съемка изображений сканирующей и просвечивающей микроскопии было выполнено в Ресурсном центре СПбГУ.

Благодарность. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю к.х.н Морозовой С.М. за помощь в организации и планировании исследования, наставничество во время обучения в аспирантуре. Особую благодарность автор выражает д.х.н Лермонтову С.А. за поддержку на всем пути обучения и при подготовке к защите диссертации. Автор благодарит сотрудников Центра Мягкой материи и Физики Флюидов МГТУ им Н. Э. Баумана и Российского центра неврологии и нейронаук, а также соавторов статей за участие в проведении экспериментов и интерпретации результатов.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с изложением и обсуждением результатов собственных исследований, заключения, списка литературы и списка сокращений. Диссертация изложена на 166 страницах, иллюстрирована 5 таблицами и 73 рисунками. Список литературы включает 257 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрено термочувствительное поведение водных растворов поли(N-изопропилакриламида) (ПНИПАМ), факторы, влияющие на его низшую критическую температуру растворения. Приведены методы получения гидрогелей на основе ПНИПАМ. Обсуждены реологические свойства гелей необходимые для экструзионной 3D-печати. Проведено обсуждение применения мягких материалов на основе ПНИПАМ.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В главе описаны исходные вещества, методики проведения модификаций и синтеза полимеров и использованные в работе физико-химические методы исследования свойств полученных материалов. А также методики выделения и работы клеточных культур, протоколы окрашивания, МТТ-теста и исследования релиза лекарственного средства.

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Физический гель на основе ПНИПАМ

В данной части работы было исследовано физическое гелеобразование коллоидной системы, основанное на физических взаимодействиях между анизотропными стержневыми наночастицами нанокристаллической целлюлозы (НКЦ) и термочувствительным поли(N-изопропилакриламидом) (ПНИПАМ).

Гелеобразование изучалось при соотношении компонентов по массе $P_{\text{ПНИПАМ}} / \text{НКЦ} = 0.5 - 4.0$ (здесь и далее массовое соотношение будет обозначено как $P_{\text{ПНИПАМ}/\text{НКЦ}}^m$) и общей массовой концентрации, $C_{\text{общ}}$, от 4 до 16 масс. % при комнатной температуре (25°C) и температуре человеческого тела (37°C).

Коллоидная стабильность НКЦ обусловлена полуэфирным группам $-\text{SO}_3\text{H}$ и концентрация этих групп составляет 32 ммоль/г, основываясь на содержании серы как 1.03 масс. %. Адсорбция ПНИПАМ на поверхности НКЦ достигалась за счет физических взаимодействий, а именно образования водородных связей между группами $-\text{OH}$ и $-\text{SO}_3\text{H}$ у НКЦ и $-\text{NH}$ и $-\text{C}=\text{O}$ группами ПНИПАМ, а также гидрофобных взаимодействий (рисунок 1).

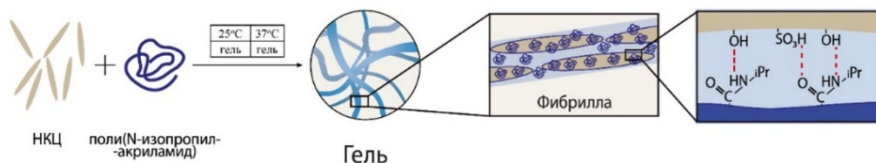


Рисунок 1 – Схема образования коллоидного геля из водной дисперсии НКЦ и водного раствора ПНИПАМ

Полученные гели обладают термочувствительными свойствами и полупрозрачны при комнатной температуре и становятся непрозрачными при повышении температуры выше нижней критической температуры растворения (НКТР) ПНИПАМ.

В качестве рабочей температуры мы выбрали 37°C , которая удовлетворяет критерию $T > T_{\text{НКТР}}$, где НКТР – нижняя критическая температура растворения ПНИПАМ ($\sim 32^{\circ}\text{C}$), и совпадает с биологической температурой тканей. Путем изменения $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ и $c_{\text{общ}}$ была получена диаграмма состояния коллоидной системы ПНИПАМ / НКЦ при комнатной температуре (25°C) и 37°C (рисунок 2 а, б). При 25°C образовывался гель при $c_{\text{общ}} > 8$ масс.% и $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ от 0,5 до 1,7 (рисунок 2а, область геля), в то время как при остальных соотношениях система выглядела как однородная полупрозрачная жидкость (рисунок 2а, область золя).

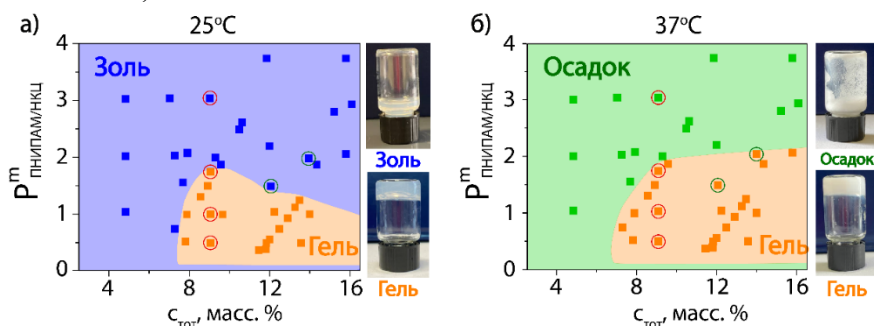


Рисунок 2 – Диаграммы состояния водной дисперсии НКЦ и ПНИПАМ при (а) 25°C ; (б) 37°C

Были исследованы реологические свойства гидрогелей в зависимости от общей концентрации и соотношений ПНИПАМ и НКЦ. Для соотношения $R_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ при увеличении $c_{\text{общ}}$

компонентов с 7 до 13 масс. %, модуль сдвига G' изменялся при 25 °C с 180 до 293 Па (рисунок 3а).

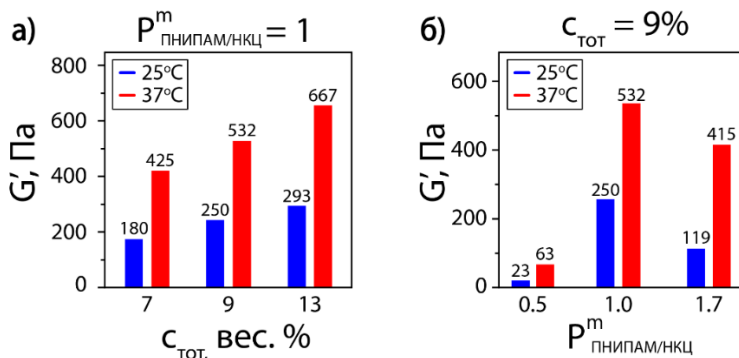


Рисунок 3 – (а) Зависимость значений модуля сдвига G' для гелей с одинаковым $P^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}} = 1$ и различными $c_{\text{общ}}$, (б) зависимость значений модуля сдвига G' для гелей с одинаковым $c_{\text{общ}} = 9$ масс. % и различными $P^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}$

Для $c_{\text{общ}} = 9$ масс. %, наибольшее значение модуля сдвига G' было достигнуто при соотношении $P^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}} = 1$ и составляет 250 Па при 25 °C, и 540 Па при 37 °C. При соотношении $P^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}} = 0,5$ G' составляет 23 Па при 25 °C, и 63 Па при 37 °C. И при соотношении $P^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}} = 1,7$ G' составляет 119 Па при 25 °C и 415 Па при 37 °C. При изменении с $P^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}} = 1$ до $P^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}} = 1,7$ наблюдается снижение G' в 2.1 раза при 25 °C и в 1.3 раза при 37 °C (рисунок 3б). Чем выше содержание ПНИПАМ в системе, тем выше разница для G' при 25 °C и 37 °C (119 и 415) и (23 и 63) в 3.5 раза и 2,7 раз соответственно.

Благодаря тому, что гели образуются в результате физических взаимодействий (сил притяжений и водородных связей), они демонстрируют тиксотропные свойства, т.е. снижение вязкости при увеличении скорости сдвига, что очень выгодно для применения гелей в качестве чернил для прямого письма чернилами или 3Д-печати на основе экструзии. Гель с $c_{\text{общ}} = 13$ масс. %, $P^m_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}} = 1$ был выбран в качестве чернил, поскольку он имеет самые высокие значения G' среди других композиций с другой массовой долей и другими соотношениями. G' увеличивается с 293 Па до 667 Па при повышении температуры с 25 до 37 C (рисунок 4а).

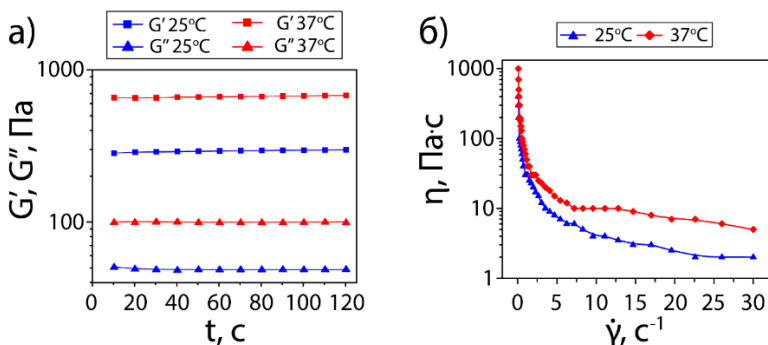


Рисунок 4 – Реологические свойства геля при $c_{\text{общ}} = 13,0$ масс. % и $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$: а) зависимость модуля сдвига G' и модуля потерь G'' от времени при деформации 1% и 10 рад/с; б) изменение вязкости геля при сдвиге η , построенное в зависимости от скорости сдвига $\dot{\gamma}$

Поведение геля при сдвиге было подтверждено реологическими исследованиями вязкости при сдвиге, η , при различных скоростях сдвига, $\dot{\gamma}$, (рисунок 4б). При $\dot{\gamma} = 0.1 \text{ с}^{-1}$, вязкость составляла 400 и 1000 Па·с для 25 и 37 °С, соответственно, и при $\dot{\gamma} = 30 \text{ с}^{-1}$, вязкость уменьшалась до 2 и 5 Па·с для 25 и 37 °С, соответственно.

Таким образом, чернила обладают реологическими свойствами, которые можно использовать для экструзионной печати: разжижением при сдвиге и быстрым восстановлением вязкости чернил после снижения напряжения сдвига. Печать при 25 °С более выгодна, чем печать при 37 °С, из-за более высокого восстановления чернил.

Выбранный состав геля с $c_{\text{общ}} = 13$ масс. %, $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$, был протестирован для прямого письма чернилами с использованием шприца с 22G иглой при 25 °С. Выбор соотношения $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m$ это объясняется его наиболее высокой биосовместимостью и самым высоким модулем сдвига среди других соотношений. На рисунке 5 показано, что проявленные чернила были выдавлены в виде непрерывной однородной нити при 25 °С (краситель использовался для увеличения контраста между гелем и водной средой).

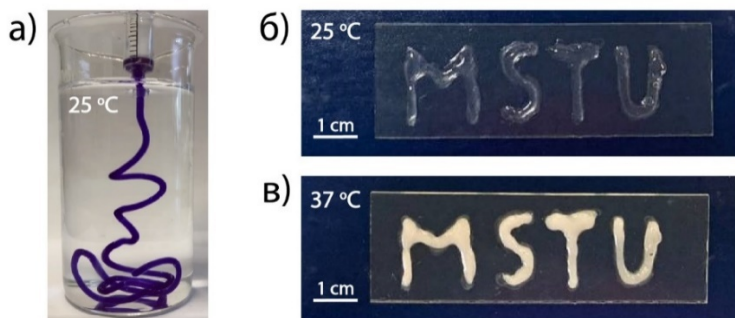


Рисунок 5 – (а) экструзия образца геля при 25 °С (для достижения более высокой контрастности в водной среде был добавлен краситель бромфеноловый синий); (б) логотип университета, полученный прямым нанесением чернил $c_{\text{тот}} = 13$ масс.%, $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ (температура чернил 25 °С) на стеклянной подложке при 25 °С; (в) логотип университета, полученный прямым нанесением геля $c_{\text{тот}} = 13$ масс.%, $P_{\text{ПНИПАМ/НКЦ}}^m = 1$ (температура чернил 25 °С) на стеклянной подложке при 37 °С

Чтобы использовать свойства полученных чернил при истончении при сдвиге, мы исследовали эффективность гидрогеля в качестве материала для инъекций путем ручной экструзии из шприца на горизонтальную поверхность предметного стекла для получения логотипа университета (рисунок 5б). После экструзии гидрогель сохранил свою нитевидную форму и сформировал предварительно разработанный рисунок, что подтверждает свойства разработанных чернил к истончению при сдвиге (рисунок 5б). Экструдированный рисунок был полупрозрачным при 25 °С (рисунок 5б) и становится непрозрачным (матовым) при нагревании до 37 °С (рисунок 5в).

Таким образом, в ходе выполнения работы были разработаны термочувствительные фибриллярные гидрогели на основе физических взаимодействий НКЦ и ПНИПАМ для имплантов и инжектируемых систем доставки лекарств. Предлагаемая гидрогелевая система представляет собой платформу для разработки биомедицинских мягких роботов, поскольку состоит из биосовместимых компонентов и работает в температурном диапазоне, близком к человеческому телу.

3.2 Гель на основе ПНИПАМ, привитого к нанокристаллической целлюлозе

Глиобластома – наиболее распространенная и агрессивная форма рака головного мозга. Медикаментозное лечение затруднено из-за сложности проникновения химиотерапевтических препаратов через гематоэнцефалический барьер и хирургического удаления опухолей, в 90% случаев они вновь появляются вблизи первоначального очага. Для решения этой задачи была разработана биосовместимая коллоидная система с термочувствительным гелеобразованием в качестве перспективного материала для заполнения послеоперационных полостей в головном мозге. Гидрогель сформирован из нанокристаллической целлюлозы (НКЦ) и поли(N-изопропилакриламида) (ПНИПАМ) и является жидким в условиях инъекции (при комнатной температуре) и превращается в гель при температуре тела человека.

Поверхность НКЦ была функционализирована методом «прививки к» с использованием поли(N-изопропилакриламида), синтезированного полимеризацией с обратимым переносом цепи (ОПЦ). Метод «прививки к» был выбран для модификации НКЦ из-за более точного контроля плотности прививки и молекулярно-массового распределения полимера по сравнению с подходом «прививки от». Сначала ПНИПАМ был получен ОПЦ-полимеризацией с использованием ОПЦ-агента, содержащего азидогруппу, а именно 2-(додецилтиокарбонотиоилтио)-2-метилпропионовой кислоты, 3-азидо-1-пропанолевого эфира (рисунок 6а, вверху слева). Синтезированный полимер имеет $M_n = 40\,000$ и узкое молекулярно-массовое распределение $M_w/M_n = 1,15$ согласно данным гельпроникающей хроматографии. Затем поверхность НКЦ была модифицирована алкиновыми группами путем реакции с пропаргилбромидом (рисунок 6а, слева внизу). Прививка полимера к наночастицам осуществлялась путем реакции Хьюсгена 1,3-азидалкина циклоприсоединения между азидо-концевыми группами в ПНИПАМ и алкиновыми группами на поверхности НКЦ (рисунок 6а, справа).

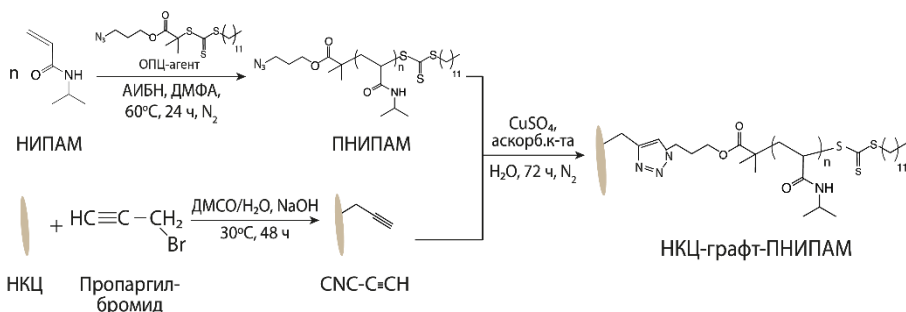


Рисунок 6 – Схема синтеза НКЦ, привитого к ПНИПАМ (НКЦ-графт-ПНИПАМ)

Плотность прививки полимера на поверхность НКЦ составляла 160 ± 20 мкмоль/г и определялась титрованием групп -NH_2 , образующихся при аминоллизе НКЦ-графт-ПНИПАМ. Плотность прививки, основанная на элементном анализе серы, составила 146 ± 25 мкмоль/г, что согласуется с данными титрования.

Термочувствительные свойства «привитого к» полимера привели к появлению обратимого термически индуцированного гелеобразования дисперсий наночастиц при температурах выше нижней критической температуры раствора (НКТР) ПНИПАМ. При комнатной температуре плюс 25°C ($T < T_{\text{НКТР}}$) вода для привитого ПНИПАМ является хорошим растворителем, а полимер имеет форму расслабленного гауссового клубка (рисунок 7а, слева). Когда температура повышается до 37°C ($T < T_{\text{НКТР}}$), клубки сжимаются до состояния глобул, что приводит к самосборке наночастиц в фибриллярный гель (рисунок 7а, справа). Мы выбрали температуру 37°C , потому что это температура человеческого тела, и она точно выше, чем НКТР ПНИПАМ.

На рисунке 7б показаны изменения оптических свойств 7 масс. % дисперсии НКЦ-графт-ПНИПАМ в процессе термочувствительного обратимого гелеобразования. При комнатной температуре 25°C ($T < T_{\text{НКТР}}$) дисперсия НКЦ-графт-ПНИПАМ выглядит как полупрозрачная жидкость (рисунок 7б, слева), в то время как при 37°C ($T < T_{\text{НКТР}}$) она образует плотный непрозрачный гель (рисунок 7б, справа).

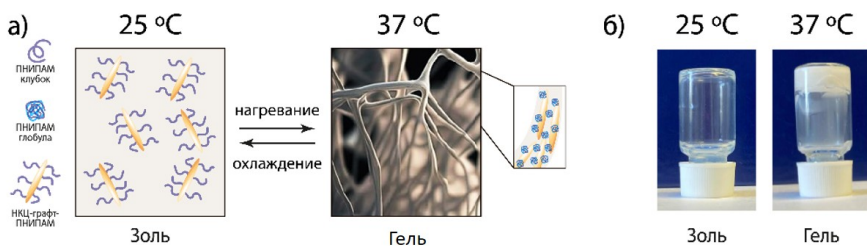


Рисунок 7 – (а) Схема температурного гелеобразования водной дисперсии НКЦ-графт-ПНИПАМ; б) внешний вид водной дисперсии НКЦ-графт-ПНИПАМ в виде золя при 25 °С (слева) и в виде геля при 37 °С (справа)

Свойства системы зависят от состава (соотношение компонентов, концентрация), который может быть использован для выбора соотношений таким образом, чтобы он соответствовал заданным свойствам. Мы варьировали концентрацию, чтобы выбрать оптимальную механику материала, сопоставимую с литературными данными о механике различных отделов мозга (рисунок 8а). Для концентрации 3 масс. % значения G' равного 60 Па были слишком малы по сравнению со средним значением для того же модуля для головного мозга (G' равного от 300 до 1050 Па). 9 и 12 масс. % были слишком высокими. Поэтому для дальнейших исследований мы выбрали 7 масс. % раствор с G' равным 460 Па.

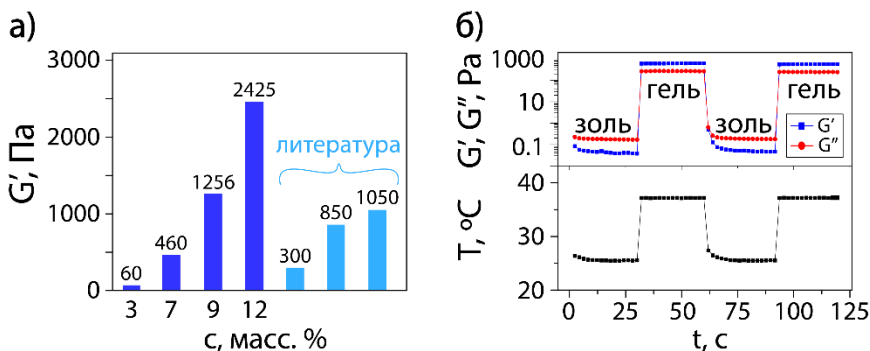


Рисунок 8 – а) Изменение G' при частоте 1 Гц для водной дисперсии НКЦ-графт-ПНИПАМ в различных концентрациях и литературные данные для ткани головного мозга; б) изменение значений G' и G'' для водной дисперсии НКЦ-графт-ПНИПАМ 7 масс. % (вверху) при циклировании температуры от 25 до 37 °С (внизу)

Обратимость гелеобразования с повышением температуры была доказана циклическим изменением температуры (рисунок 8б). Мы изучали изменение G' и G'' при циклическом изменении T от 25 °С до 37 °С, то есть быстрое образование геля ($G' > G''$) с повышением температуры и образование золя ($G' < G''$) с понижением температуры. На первом этапе при 25 °С система представляет собой золь - $G' = 0,05 \pm 0,01$ Па, $G'' = 0,19 \pm 0,01$ Па. Повышение температуры до 37 °С приводит к образованию геля, модули увеличились G' в 16 140 раз, G'' в 1 789 раз ($G' = 807 \pm 12$ Па, $G'' = 340 \pm 3$ Па). Снижение температуры до 25 °С обратно пропорционально уменьшает модули в 8 070 и 1 700 раз соответственно ($G' = 0,1 \pm 0,1$ Па, $G'' = 0,2 \pm 0,1$ Па). Значения, возвращенные для G' , увеличились на 50 %, G'' - на 100 %. Последующее повторное повышение температуры приводит к образованию геля ($G' = 737 \pm 10$ Па, $G'' = 309 \pm 3$ Па), то есть значения восстанавливаются (возвращаются для G' почти на 91 %, G'' на 91 %).

Для исследования биологических свойств гидрогелей были использованы первичные культуры астроцитов головного мозга крыс и эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга в концентрациях $5 \cdot 10^6$ клеток/мл (рисунок 9). Оба типа клеток прилипают к гелю, пролиферируют, начинают экспрессировать ZO1 или GFAP и не демонстрируют значительных уровней апоптоза.

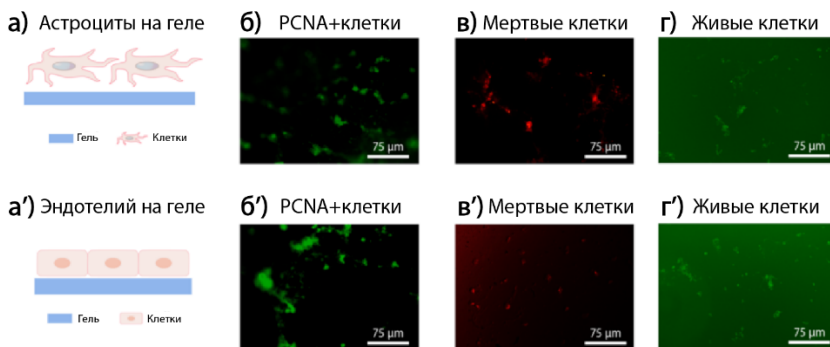


Рисунок 9 –Иммуно- и апоптозное окрашивание астроцитов (а) и эндотелиальных клеток (б), выращенных на стандартном растворе внеклеточного матрикса с помощью набора для анализа ангиогенеза (*in vitro*)

Таким образом был разработан материал с термочувствительным гелеобразованием на основе НКЦ, привитого ПНИПАМ. Благодаря биосовместимости с эндотелиальными клетками и астроцитами (клетками мозга) гель перспективен для применения в качестве импланта участков мозга, удаленных хирургическим путем, а также микрофлюидных моделей мозга на чипе, пригодных для эффективного скрининга кандидатов на лекарственные препараты и анализа проницаемости гематоэнцефалического барьера при патогенезе физиологического состояния.

3.3 Мультистимул-чувствительный однослойный актюатор

Мультистимул-чувствительные гидрогели – важный класс мягких актюаторов, поскольку они позволяют расширить диапазон возможных движений и реакций, более точно имитируя живую материю. Термочувствительные чернила создают локальные внутренние напряжения, которые приводят к изменению формы гидрогеля. Магниточувствительные чернила позволяют перемещать гидрогель в пространстве, притягивая его к магниту. На рисунке 10а показана схема изготовления двух разработанных типов чернил: термочувствительных (чернила 1) и магнитных (чернила 2). Термочувствительные чернила 1 состоят из водного раствора N-изопропилакриламида, N,N'-метиленбисакриламида в качестве сшивающего вещества и УФ-инициатора, а также альгината натрия. Смесь этих веществ может быть подвергнута УФ-полимеризации с образованием ковалентно сшитого гидрогеля благодаря фотополимеризации чернил НИПАМ (рисунок 10б', 10б"). Последующее замачивание этого геля в водном растворе CaCl_2 улучшает его механические свойства за счет образования ионных сшивок в альгинате кальция. Магнитные чернила 2 были изготовлены на основе магнетита Fe_3O_4 , нанокристаллической целлюлозы и альгината натрия и представляет собой тиксотропный черный гидрогель (рисунок 10б", 10б"""). Последующее замачивание этих гелей в водном растворе CaCl_2 приводит к исчезновению тиксотропных свойств и фиксации формы за счет образования ионных сшивок в альгинате кальция.

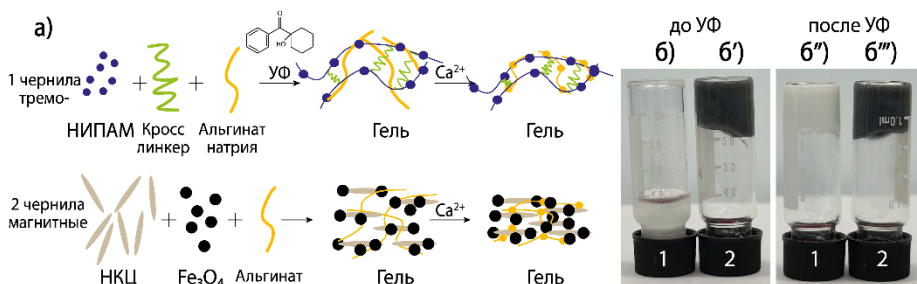


Рисунок 10 – (а) Схема приготовления чернил. Вверху: термочувствительные чернила 1; внизу: магниточувствительные чернила 2. Фотографии чернил 1 (б) и 2 (б') до УФ-облучения. Фотографии чернил 1 (б'') и 2 (б''') после УФ-облучения

Чернила обладают тиксотропными свойствами, то есть они способны разжижаться при приложенном напряжении. Для количественного подтверждения этого свойства были изучены показатели реологической вязкости η при различных скоростях сдвига $\dot{\gamma}$ (рисунок 11а). При $\dot{\gamma} = 0,1 \text{ с}^{-1}$ вязкость составляла 18834 и 640 Па·с для термочувствительных чернил и магнитных чернил, соответственно, а при $\dot{\gamma} = 30 \text{ с}^{-1}$ вязкость снижалась до 6 и 1,4 Па·с для термочувствительных чернил и магнитных чернил, соответственно. Мы также изучили восстановление η при циклическом изменении $\dot{\gamma}$ от 0,1 до 40 с^{-1} , то есть «самовосстанавливающиеся» свойства коллоидного геля, которые определяют его способность сохранять свою форму после напряжения сдвига или экструзии (рисунок 11б). Для термочувствительных чернил при начальном значении $\dot{\gamma} = 0,1 \text{ с}^{-1}$ значение η составляло $530 \pm 41 \text{ Па·с}$, увеличение $\dot{\gamma}$ до 40 с^{-1} приводило к уменьшению η в 266 раз. Последующее снижение $\dot{\gamma}$ до 0,1 с^{-1} привело к увеличению η до $200 \pm 25 \text{ Па·с}$, то есть к восстановлению почти на 40% от первоначального значения η . Для магнитных чернил начальное значение $\dot{\gamma} = 0,1 \text{ с}^{-1}$, значение $\eta = 42 \pm 5 \text{ Па·с}$, увеличение $\dot{\gamma}$ до 40 с^{-1} привело к уменьшению η в 40 раз. Последующее снижение $\dot{\gamma}$ до 0,1 с^{-1} привело к увеличению η до $51 \pm 6 \text{ Па·с}$, то есть к восстановлению на 121% первоначального значения η . Таким образом, оба вида чернил обладают реологическими свойствами, которые можно использовать для экструзионной печати или прямого письма чернилами: разжижаются при сдвиге (плавно протекают через сопло шприца) и быстро восстанавливают вязкость чернил после снижения напряжения сдвига (сохраняют форму после печати).

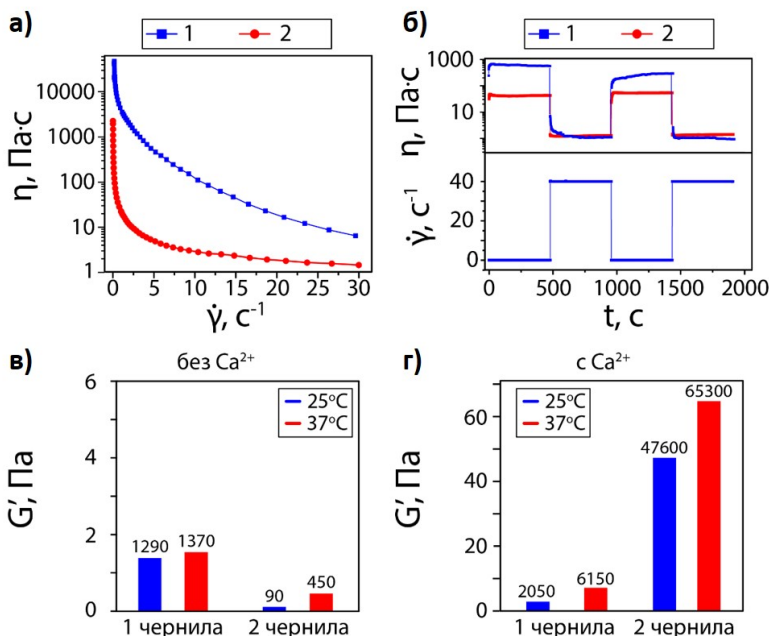


Рисунок 11 – (а) Изменение вязкости геля при сдвиге η , построенное в зависимости от скорости сдвига $\dot{\gamma}$ (чернила 1 - термочувствительные чернила, чернила 2 – магнитные чернила). (б) Зависящее от времени изменение вязкости геля при сдвиге η (вверху) при соответствующем изменении $\dot{\gamma}$ (внизу). (в) Значения модуля хранения для чернил без добавления раствора хлорида кальция при 25 °C и 37 °C. (г) Значения модуля хранения для чернил с добавлением раствора хлорида кальция при температуре 25 °C и 37 °C

Чтобы скрепить чернила между собой, к ним добавляли раствор хлорида кальция, образуя альгинат кальция из альгината натрия. Для изучения влияния ионов кальция на чернила были исследованы модули хранения G' для чернил без ионов кальция (рисунок 11в) и с добавлением ионов кальция (рисунок 13г) при 25 °C и 37 °C. Значения G' для термочувствительных чернил увеличились в 1,6 раза при 25 °C (с 1290 Па до 2050 Па) и в 4,5 раза при 37 °C (с 1370 Па до 6150 Па) соответственно. Для магнитных чернил значения G' увеличились в 512 раз при 25 °C (с 90 Па до 47600 Па) и в 143 раза при 37 °C (с 450 Па до 65300 Па) соответственно. Разница между термо- и магнитными чернилами может быть обусловлена различным содержанием альгината натрия в составах

чернил (67 мг/г и 240 мг/г для термо- и магнитных чернил соответственно).

Идея работы заключалась в том, чтобы объединить в одном материале два типа движения и возможность выполнять их по отдельности. Изменение формы было вызвано нанесением рисунка термочувствительными чернилами, а линейное перемещение всей системы в пространстве было результатом притяжения к постоянному магниту из-за присутствия магнитных чернил. Компоненты различных чернил удерживаются вместе благодаря электростатическим силам и поперечным связям, образованным альгинатом кальция. Более подробно, термочувствительные чернила заряжены отрицательно (дзета-потенциал ПНИПАМ ζ , $\zeta < 0$), а магнитные чернила обладают положительным зарядом из-за избытка наночастиц магнетита ($\zeta = + 33$ мВ), в то время как для НКЦ ζ составляет - 44 мВ. Добавление ионов кальция позволяет связывать полоски альгинатом кальция, который представляет собой плотный гель и не позволяет полоскам распадаться.

Рисунок, основанный на чередующихся полосах двух чернил, мог скатываться из-за анизотропного набухания, имитируя поведение *Pteridium aquilinum* (рисунок 12а). Подготовленный однослойный лист гидрогеля помещали в воду, нагретую до 40 °С. В течение 30 секунд наблюдалось складывание актюатора из-за перехода ПНИПАМ в глобулу (рисунок 12а). Приведение в действие было обратимым, и гидрогели сохраняли способность притягиваться к магниту.

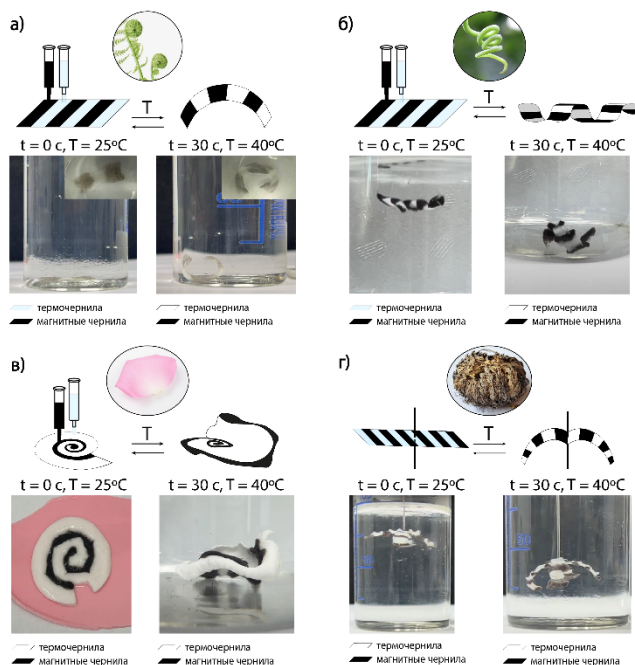


Рисунок 12 – (а) Схема обработки материала и внешний вид экструдированных однослойных листов гидрогеля при температуре 25°C (слева) и изгиб актюатора при температуре 37°C (справа); (б) схема приведения в действие спирали и внешний вид актюатора при температуре 25°C (слева) и изгибе материала при температуре 37°C (справа); (в) схема придания формы лепестка розы и внешний вид однослойного гидрогеля при 25°C (слева) и трансформация формы материала при 37°C (справа); (г) схема приведения в действие захвата и внешний вид однослойного гидрогелевого захватчика при температуре 25°C (слева) и изгибе материала при температуре 37°C (справа)

Когда полосы с разными красками располагались под углом к главной оси материала, вместо рулона получалась спираль (рисунок 12б), имитирующая изменение формы *Pisum sativum*. Более сложные узоры, например, плоская спираль, образуют формы, близкие к лепесткам цветов (рисунок 12в). Таким образом, вариации 2D-узора позволяют запрограммировать 3D-форму конечного материала за счет различий в набухании используемых чернил.

Более того, объединив несколько полосок, можно было

сформировать мягкий захватчик, вдохновленный растениями *S. lepidophylla* (рисунок 12г). При повышении температуры захват на основе гидрогеля начал изгибаться из-за температурного перехода ПНИПАМ, имитирующего захват рукой. После охлаждения системы до 25 °С актюатор постепенно принимает свою плоскую форму. Сочетая способность изготовленного актюатора к изгибу и возможность магнитного отклика, эти характеристики делают его пригодным для манипулирования мягкими предметами.

Таким образом создан мультистимульный актюатор, который при помещении в воду, нагретую до 40 °С, принимает запрограммированную за счет распределения компонентов форму и способен к перемещению за счет притяжения к постоянному магниту. Сочетание независимой реакции на стимулы и возможность программирования 3D-структуры актюатора делают его подходящим для производства медицинских устройств и инвазивных биомедицинских применений.

ВЫВОДЫ

1. Получены диаграммы состояния системы на основе ПНИПАМ и НКЦ при комнатной температуре (25 °С) и температуре живого организма (37 °С), выделены зоны золя, геля и осадка. Были выбраны составы, образующие гель и при 25 °С, и при 37 °С, и изучены их реологические свойства в зависимости от состава и температуры, а также была продемонстрирована их тиксотропность.

2. Показано, что коллоидные гели ПНИПАМ / НКЦ обладают фибриллярной структурой, термочувствительной прозрачностью и биосовместимостью с клетками, что делает эти гидрогели подходящими для имплантов и инъектируемых систем доставки лекарств. Предлагаемая гидрогелевая система представляет собой платформу для разработки биомедицинских мягких актюаторов, поскольку состоит из биосовместимых компонентов и работает в температурном диапазоне, близком к человеческому телу.

3. Разработан материал с термочувствительным гелеобразованием на основе НКЦ, к которым привит ПНИПАМ. Определен диапазон массовых концентраций коллоидной системы НКЦ-графт-ПНИПАМ для образования термочувствительного тиксотропного геля при 37 °С, изучены реологические свойства, подобраны такие массовые концентрации для соответствия параметрам разных отделов серого вещества мозга.

4. Обнаружена биосовместимость с эндотелием

микрососудов головного мозга и астроцитами коры головного мозга (первичными клетками мозга) геля НКЦ-графт-ПНИПАМ, поэтому он перспективен для применения в качестве импланта участков мозга, удаленных хирургическим путем, а также микрофлюидных моделей мозга на чипе, пригодных для эффективного скрининга кандидатов на лекарственные препараты и анализа проницаемости гематоэнцефалического барьера при патогенезе физиологические состояния.

5. Получено два вида чернил: с термочувствительным откликом на основании ПНИПАМ и магнитным откликом за счет содержания магнетита. Совмещая чернила, был создан мультистимульный актюатор, который при помещении в воду, нагретую до 40 °С, принимает запрограммированную за счет распределения компонентов форму (ролл, спираль, лепесток и захватчик) имитирует движение растений и способен к перемещению за счет притяжения к постоянному магниту.

6. Изучена независимая реакция полученного актюатора на стимулы (температура и магнитное поле) и возможность программирования 3D-структуры. Эти свойства делают актюатор подходящим для производства медицинских устройств и инвазивных биомедицинских применений.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. Belyaeva A. A., Tretyakov, I. V., Kireynov, A. V., Nashchekina, Y. A., Solodilov, V. I., Korzhikova-Vlakh, E. G., Morozova, S. M. Fibrillar biocompatible colloidal gels based on cellulose nanocrystals and poly (N-isopropylacrylamide) for direct ink writing //Journal of Colloid and Interface Science. – 2023. – Т. 635. – С. 348-357. DOI: 10.1016/j.jcis.2022.12.106.

2. Belyaeva A. A., Eksakusto P. O., Morozova S. M. Thermally and magnetically responsive single layer bioinspired soft actuator with patterned structure obtained by direct ink writing //Materials Today Communications. – 2024. – Т. 39. – С. 108879. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2024.108879.

3. Belyaeva A. A., Averchuk, A. S., Rozanova, N. A., Alexandrova, O. P., Solomakha, O. A., Nashchekina, Y. A., Korzhikov-Vlakh V. A, Yurchenko S. O, Salmina A. B, Korzhikova-Vlakh E.G., Morozova, S. M. Thermosensitive injectable fibrillar gels based on cellulose nanocrystals grafted with poly (N-isopropylacrylamide) as biocompatible brain implants //Carbohydrate Polymers. – 2024. – С. 122596. DOI: 10.1016/j.carbpol.2024.122596.