

Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»


На правах рукописи

Царева Анастасия Денисовна

**ПОЛИМЕРНЫЙ БИОРАЗЛАГАЕМЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА
ДЛЯ СОЗДАНИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ**

1.4.4. Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Иванов Дмитрий Анатольевич

федеральная территория «Сириус»

2026

Оглавление

Введение	6
Глава 1. Литературный обзор	13
1.1 Метод электроформования и области его применения	13
1.2 Оборудование и техническая организация процесса электроформования.....	14
1.2.1 Установка для электроформования волокон	14
1.2.2 Свойства полимерного раствора	16
1.2.3 Оптимизация параметров электроформования.....	18
1.2.4 Влияние условий окружающей среды на электроформование	19
1.3 Электроформование	22
1.3.1 Процесс формирования полимерных волокон.....	22
1.4 Разновидности электроформования	23
1.4.1 Электроформование из расплава.....	24
1.4.2 Электроформование многокомпонентных систем	25
1.4.3 Коаксиальное электроформование	25
1.4.4 Эмульсионное электроформование	26
1.4.5 Методы получения ориентированных волокон	26
1.5 Полимеры, используемые в электроформовании для целей тканевой инженерии .	30
1.5.1 Применение природных и растительных полимеров в электроформовании для целей тканевой инженерии.....	30
1.5.2 Применение синтетических полимеров в электроформовании для тканевой инженерии.....	37
1.5.2.1 Полимолочная кислота (ПЛА)	37
1.5.2.2 Поли(ϵ -капролактон) (PCL)	39
1.5.2.3 Полиамид-6 (РА6)	41
1.5.2.4 Полигидроксиалканоаты (РНА)	41
1.6 Влияние поверхностно-активных веществ (ПАВ) на электроформование	42
1.6.1 Применение анионных ПАВ в процессе электроформования	43
1.6.2 Применение катионных ПАВ в процессе электроформования	43

1.6.3 Применение неионогенных ПАВ в процессе электроформования	44
1.7 Виды деградации полимеров.....	45
1.8 Тканевая инженерия с использованием полимерных матриц, полученных методом электроформования	46
1.8.1 Полимерные матрицы для регенерации кожи	47
1.8.2 Полимерные матрицы для регенерации нервной ткани.....	48
1.8.3 Полимерные матрицы для регенерации костной ткани.....	49
1.9 Выводы по литературному обзору.....	49
Глава 2. Материалы и методы	50
2.1 Материалы.....	50
2.2 Получение волокнистых матриц методом электроформования	50
2.3 Получение направленных волокнистых матриц альтернативными методами ...	51
2.4 Оценка морфологии волокон методом сканирующей электронной микроскопии..	53
2.5 Характеризация внутренней структуры методом сканирующей просвечивающей электронной микроскопии.....	54
2.6 Квасистатические испытания на растяжение	54
2.7 Исследование теплофизических свойств полимерных электроформованных матриц	55
2.8 Малоугловое и широкоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР/БУРР)	55
2.9 Оценка потери массы матриц в PBS и растворе Фентона	57
2.10 Оценка роста клеточных культур на матрицах.....	57
2.11 Оценка жизнеспособности клеток	58
2.12 Оценка биосовместимости полилактидных матриц в модели хорионаллантоисной мембраны куриного эмбриона (ХАМ)	59
2.13 Подготовка парафиновых блоков для гистологии, окрашивание срезов	60
2.14 Статистическая обработка данных	60
Глава 3. Результаты и обсуждение	62
3.1 Морфология волокон из ПЛА на основе разных растворителей и их смесей.....	62

3.2 Влияние ПАВ и гиалуроната натрия на морфологию ПЛА-волокон и ее изменение при инкубации в модельных средах	67
3.3 Потеря массы ПЛА-матриков при инкубации в PBS и растворе Фентона	75
3.4 Механические характеристики материалов на основе ПЛА, полученных методом смесового и эмульсионного электроформования.....	80
3.5 Формирование ориентированных ПЛА-матриков с использованием параллельных электродов и постоянных магнитов	85
3.6 Морфология направленных волокон, полученных вытяжкой в этаноле	87
3.7 Механические свойства ориентированных матриков	100
3.8 Дифференцирующая сканирующая калориметрия	105
3.9 Анализ структуры методом малоуглового и широкоуглового рентгеновского рассеяния.....	108
3.10 <i>In vitro</i> исследование материалов на клеточных культурах	113
3.10.1 Клеточный ответ HDF на матриках с различной топологией	114
3.10.2 Клеточный ответ UC–MSC на матриках с различной топологией	116
3.10.3 Количественный анализ заселения HDF и UC–MSC матриков	117
3.10.4 Сопоставление с ранее опубликованными данными на модели первичной нейрональной культуры.....	119
3.10.5 Выводы по главе 3.10	120
3.11 Оценка тканевого ответа на клеточно-матричные конструкции в модели хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона	121
3.11.1 Макроскопическая оценка взаимодействия матриков с XAM (HDF).....	121
3.11.2 Макроскопическая оценка взаимодействия матриков с XAM (UC-MSC).....	123
3.11.3 СЭМ-анализ матриков с HDF после имплантации в XAM	125
3.11.4 СЭМ-анализ матриков с UC–MSC после имплантации в XAM	127
3.11.5 Гистологический анализ срезов зон имплантации матриков с HDF и UC–MSC, имплантированных в XAM	129
3.11.6 Выводы по главе 3.11	132
Заключение.....	133
Благодарности.....	135

Список сокращений и условных обозначений	136
Список литературы.....	138
Приложения	155
Приложение А ЭДС-анализ.....	155
Приложение Б СПЭМ-анализ.....	158
Приложение В СЭМ-анализ ПЛА-матриц.....	159
Приложение Г Анализ биосовместимости пористых и гладких матриц на модели ХАМ	160

Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Создание полимерных биоразлагаемых материалов для медицинских изделий является актуальной задачей современной физической химии полимеров, материаловедения и регенеративной медицины. Среди таких материалов особое место занимают волокнистые матриксы на основе полилактида, получаемые методом электроформования. Электроформование позволяет получать нетканые материалы из микро- и нановолокон с высокой удельной поверхностью, развитой пористой структурой и возможностью регулирования состава, диаметра, ориентации и поверхностных свойств волокон. Благодаря этим свойствам электроформованные матриксы перспективны для создания раневых и ожоговых покрытий, носителей лекарственных веществ и клеток, а также тканеинженерных конструкций.

Полилактид является одним из наиболее востребованных биоразлагаемых полимеров для медицинского применения вследствие его биосовместимости, способности к биорезорбции и возможности переработки различными методами. Вместе с тем полилактидные материалы характеризуются сравнительно невысокой гидрофильностью, а их свойства – морфология, механические характеристики, скорость деградации и биологическое поведение – существенно зависят от условий формирования материала. Для волокнистых полилактидных (ПЛА)-матриксов определяющую роль играет природа растворителей и состав формуемого раствора, наличие функциональных добавок, а также особенности электроформования и постобработки.

Вместе с тем существенно менее изучено взаимосвязанное влияние состава растворителей, остаточного растворителя и функциональных добавок на формирование структуры и последующие свойства электроформованных ПЛА-матриксов. В частности, остается недостаточно установленной связь между кинетикой формирования волокна, его поверхностной морфологией, присутствием поверхностно-активного вещества (ПАВ) и гиалуроната натрия (ГН), механическим поведением и устойчивостью материала к гидролитической и окислительной деструкции. Также недостаточно изучено влияние остаточного растворителя и физического состояния полимера на способность электроформованных матриксов к последующей ориентационной деформации. Установление этих взаимосвязей представляет самостоятельный физико-химический интерес и необходимо для направленного регулирования свойств волокнистых материалов.

Особый интерес представляет разработка технологически доступных смесей (систем) растворителей для формирования пористых ПЛА-волокон. В настоящей работе важное место занимает разработанная система растворителей ДТ (ДХМ–ТГФ 8:2 об./об.), защищенная патентом Российской Федерации № 2858656, которая использована в качестве технологической

основы для получения пористых ПЛА-матриков и их последующей модификации. Исследование возможности регулирования свойств таких матриков путем введения ПАВ и гиалуроната натрия представляет интерес как с фундаментальной точки зрения, так и для разработки материалов с регулируемыми механическими свойствами и устойчивостью к деградации.

Отдельной актуальной задачей является формирование матриков с ориентированными волокнами. Ориентированные волокна способны воспроизводить анизотропную организацию ряда тканей, в том числе нервной, мышечной, сухожильной и соединительной. При этом необходимы доступные методы получения направленных ПЛА-матриков, обеспечивающие высокую степень ориентации, воспроизводимость структуры и возможность варьирования механических свойств. Таким образом, актуальность работы определяется необходимостью создания и комплексного исследования биоразлагаемых волокнистых материалов на основе полилактида, перспективных в качестве основы для разработки медицинских изделий, свойства которых могут регулироваться посредством выбора системы растворителей, введения ПАВ и гиалуроната натрия, а также формирования матриков с ориентированными волокнами.

Степень разработанности

Электроформованные материалы на основе ПЛА являются объектом интенсивных исследований в связи с перспективами их применения в регенеративной медицине, тканевой инженерии и при создании биорезорбируемых медицинских изделий. К настоящему времени установлены основные закономерности влияния технологических параметров электроформования и состава прядильных растворов на морфологию волокон, пористость и механические характеристики формируемых матриков. Значительное внимание уделяется также модификации ПЛА функциональными, гидрофильными и биологически активными компонентами с целью регулирования поверхностных свойств и повышения биосовместимости материалов.

Вместе с тем ряд аспектов формирования структуры и свойств электроформованных ПЛА-матриков остается недостаточно изученным. В частности, отсутствует систематическое представление о взаимосвязи природы и остаточного содержания растворителя с физическим состоянием полимера, его структурной организацией, механическими свойствами и способностью к ориентационным перестройкам при деформации. Недостаточно исследовано также совместное влияние состава прядильной системы, функциональных добавок и постформовочной обработки на морфологию, деградационное поведение и эксплуатационные характеристики материала. В связи с этим актуальной является задача установления закономерностей, связывающих состав, условия получения, структуру и свойства биорезорбируемых ПЛА-матриков.

Цель и задачи

Целью настоящей работы являлась разработка биоразлагаемых волокнистых материалов на основе полилактида методом электроформования и установление взаимосвязей между составом формируемой системы, условиями получения, структурой волокнистых матриц, их механическими и деградационными характеристиками и биологическим ответом. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Исследовать влияние природы и состава системы растворителей на морфологию, диаметр, поверхностную пористость и структурную организацию электроформованных матриц на основе полилактида.
2. Установить влияние поверхностно-активного вещества и гиалуроната натрия на морфологию волокон, механические свойства и устойчивость ПЛА-матриц к гидролитической и окислительной деградации.
3. Разработать и сопоставить способы получения ориентированных ПЛА-матриц с использованием магнитного поля, коллекторов из параллельных лезвий и постформовочной вытяжки в этаноле; установить влияние состояния исходного материала и остаточного растворителя на эффективность ориентационной деформации.
4. Оценить биологический ответ на выбранные ПЛА-матрицы в исследованиях на клеточных культурах и на модели хорионаллантоисной мембраны куриного эмбриона и определить перспективные направления их дальнейшего биомедицинского применения.

Научная новизна

Научная новизна работы заключается в установлении физико-химических закономерностей формирования структуры и свойств электроформованных матриц на основе полилактида в зависимости от системы растворителей, состава формируемого раствора и условий последующей обработки.

1. Установлен растворитель-зависимый характер влияния поверхностно-активного вещества на формирование ПЛА-волокон. Показано, что в системе на основе гексафторизопропанола (ГФИП) введение ПАВ приводит к выраженному уменьшению диаметра волокон, тогда как в системе ДТ характер формирующейся морфологии определяется совместным действием ПАВ и гиалуроната натрия.
2. Установлена взаимосвязь между составом формируемой системы, морфологией волокон, механическими свойствами и устойчивостью ПЛА-матриц к деградации в модельных гидролитической и окислительной средах. Показано, что введение ПАВ в систему ПЛА-ДТ без гиалуроната натрия сопровождается ускоренной потерей массы и существенным снижением механических характеристик материала.

3. Выявлен выраженный совместный эффект гиалуроната натрия и ПАВ на механические свойства пористых ПЛА-матриков. Показано, что при содержании гиалуроната натрия 10 об.% присутствие ПАВ приводит к повышению прочности и жесткости по сравнению с матриком того же состава без ПАВ, тогда как увеличение содержания гиалуроната натрия до 20 об.% сопровождается снижением механических характеристик.

4. Установлено влияние остаточного растворителя и физического состояния электроформованного ПЛА-матрикса на его способность к постформовочной ориентационной деформации. Показано, что наличие остаточного растворителя в свежеполученном материале коррелирует с более однородной деформацией волокон при вытяжке в этаноле и меньшей выраженностью структурных дефектов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в развитии представлений о взаимосвязи условий формирования, структуры и свойств электроформованных материалов на основе полилактида. Установлено, что морфология и последующее поведение ПЛА-матриков определяются совокупным влиянием состава растворителей, функциональных добавок и состояния полимера после электроформования. Полученные результаты показывают взаимосвязь между формированием пористой структуры волокон, механическими свойствами и устойчивостью материала к деградации, а также выявляют роль остаточного растворителя в постформовочной ориентационной деформации ПЛА-волокон.

Практическая значимость работы состоит в разработке технологических подходов к получению пористых и ориентированных ПЛА-матриков с регулируемыми морфологическими, механическими и деградационными характеристиками. Бинарная система растворителей ДТ (ДХМ–ТГФ 8:2 об./об.) и способ получения материалов на ее основе защищены патентом Российской Федерации № 2858656. Изменение состава формуемого раствора и условий постформовочной обработки позволяет варьировать морфологию, механические свойства, устойчивость к деградации и степень ориентации волокон. Матрицы ПЛА-ДТ продемонстрировали благоприятный биологический ответ в использованных клеточных моделях и на модели ХАМ и представляют интерес для дальнейших исследований в качестве основы тканеинженерных конструкций. Состав ПЛА-ДТ-ГН-10%-ПАВ выделяется сочетанием механических и деградационных характеристик и представляет интерес для последующей биологической верификации. Ориентированные ПЛА-матрицы могут быть использованы при разработке материалов для анизотропно организованных тканей и изучения контактного ориентирования клеток.

Методология и методы исследования

Методологическую основу работы составил комплексный подход к исследованию зависимости свойств электроформованных ПЛА-матрикс от состава формируемых растворов, условий получения и последующей структурной модификации. Работа включает получение образцов из различных систем растворителей, исследование их морфологии, структурной организации, термических, механических и деградиационных свойств, а также оценку биологического ответа в условиях *in vitro* и на модели хорионаллантоисной мембраны куриного эмбриона (модель ХАМ). Для получения волокнистых матрикс использовали метод электроформования растворов полилактида, смесевое и эмульсионное электроформование, а также методы формирования ориентированных волокон с применением магнитного поля, коллекторов из параллельных лезвий и постформовочной вытяжки в этаноле. Морфологию и диаметр волокон исследовали методами сканирующей электронной микроскопии и анализа изображений с применением программ Fiji, DiameterJ и OrientationJ. Внутреннюю структуру волокон исследовали методом сканирующей просвечивающей электронной микроскопии, а элементный состав — методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Надмолекулярную структурную организацию и ориентацию полимерных цепей исследовали методами мало- и широкоуглового рентгеновского рассеяния. Термические свойства определяли методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Механические свойства матрикс определяли при одноосном растяжении. Устойчивость матрикс к деградаци оценивали по изменению массы и морфологии после инкубации в PBS и растворе Фентона, использованные, соответственно, в качестве моделей гидролитической и ускоренной окислительной деградаци. Биологический ответ оценивали в экспериментах на клеточных культурах и на модели хорионаллантоисной мембраны куриного эмбриона. Статистическую обработку и анализ экспериментальных данных проводили методами вариационной статистики и дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 10, OriginPro и Microsoft Excel.

Положения, выносимые на защиту:

1. Состав растворителей определяет морфологию электроформованных матрикс на основе полилактида: использование ГФИП приводит преимущественно к формированию гладких волокон меньшего диаметра, тогда как бинарная система ДХМ–ТГФ 8:2 об./об. обеспечивает образование более крупных волокон с развитой поверхностной пористостью.

2. Влияние поверхностно-активного вещества на формирование и свойства ПЛА-матрикс определяется составом растворителей и присутствием гиалуроната натрия. В системе ГФИП ПАВ преимущественно уменьшает диаметр волокон, тогда как в системе ДТ совместное

присутствие ПАВ и гиалуроната натрия существенно изменяет морфологические и механические характеристики матрикса.

3. Состав формуемой системы определяет взаимосвязанные механические характеристики и устойчивость ПЛА-матриксков к деградации. Введение ПАВ в матриксы ПЛА-ДТ без гиалуроната натрия сопровождается ускоренной потерей массы в PBS и растворе Фентона и резким снижением механической прочности, тогда как совместное присутствие 10 об.% гиалуроната натрия и ПАВ обеспечивает существенное повышение прочности и жесткости материала.

4. Ориентационная способность электроформованных ПЛА-матриксков определяется как способом формирования направленной структуры, так и физическим состоянием исходного материала. При постформовочной вытяжке в этаноле присутствие остаточного растворителя влияет на способность волокон к деформации и формированию ориентированной структуры без выраженных морфологических дефектов.

5. Морфология и ориентация волокон оказывают существенное влияние на биологический ответ ПЛА-матриксков: пористые матриксы ПЛА-ДТ поддерживают клеточное заселение, а направленная организация волокон вызывает преимущественную ориентацию клеток вдоль оси матрикса; присутствие ПАВ в системе ПЛА-ДТ без дополнительной оптимизации состава сопровождается менее благоприятным клеточным и тканевым ответом.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием комплекса взаимодополняющих методов исследования структуры и свойств материалов, проведением повторных измерений и статистической обработкой экспериментальных данных, а также согласованностью результатов, полученных независимыми методами. Основные выявленные закономерности воспроизводятся для серий образцов различного состава и согласуются с современными представлениями о процессах формирования, деформации и деградации электроформованных материалов на основе полилактида.

По теме диссертационной работы опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, получено 3 патента Российской Федерации и опубликовано 5 тезисов докладов. Результаты исследований были представлены и обсуждены на следующих конференциях:

1. Первый форум генетических технологий «Сириус.ТехноГенетика», Университет «Сириус», Сочи - ноябрь 2025 г.

2. Международная научно-техническая конференция «Микроэлектронные имплантируемые нейроинтерфейсы 2025» (МИН-2025) - октябрь 2025 г.

3. X Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых: «Химия: достижения и перспективы» (Лучший постерный доклад второй степени), Ростов-на-Дону - май 2025 г.

4. Международная молодежная научная конференция «Modern trends in the development of functional materials», Университет «Сириус», Сочи - ноябрь 2023 г.

5. IX Бакеевская Всероссийская школа-конференция молодых ученых с международным участием «МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАНООБЪЕКТЫ И ПОЛИМЕРНЫЕ КОМПОЗИТЫ», Тула - октябрь 2023 г.

Личный вклад автора

Постановка цели и задач диссертационной работы выполнена автором совместно с научным руководителем. Подготовка экспериментальных образцов, проведение значительной части экспериментальных исследований, обработка и анализ полученных данных выполнены лично автором. Отдельные экспериментальные исследования проводились совместно с соавторами опубликованных работ по теме диссертации. Подготовка материалов к публикации осуществлялась автором совместно с научным руководителем и соавторами. Обобщение результатов, формулировка выводов и положений, выносимых на защиту, выполнены лично автором.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, списка сокращений, библиографии и приложений. Общий объем диссертации составляет 154 страницы; работа содержит 13 таблиц, 65 рисунков. Приложения содержат 7 рисунков.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Метод электроформования и области его применения

Метод электроформования, применяемый для получения полимерных нетканых материалов, был разработан в начале XX века [1], однако значительное внимание в области биомедицинских приложений он привлек в последние десятилетия [2–5]. Метод позволяет формировать полимерные матриксы, состоящие из микро- и нановолокон. Основными компонентами установки для электроформования являются система дозированной подачи полимерного раствора или расплава, игла или другое формующее сопло, высоковольтный источник питания и коллектор для сбора волокон. Под действием электрического поля на конце иглы формируется конус Тейлора, из вершины которого вытягивается полимерная струя. В процессе движения струи к коллектору происходят ее растяжение, истончение и затвердевание вследствие испарения растворителя или охлаждения расплава [6].

Одним из наиболее значимых направлений применения электроформования является получение волокнистых материалов для биомедицинских целей. Такие материалы могут состоять из хаотично расположенных или ориентированных микро- и нановолокон с регулируемым диаметром, пористостью и морфологией поверхности. В тканевой инженерии для их получения широко используются биоразлагаемые полимеры, включая полилактид (ПЛА) [7], поли(лактид-ко-гликолид) (PLGA) [7], поли(ϵ -капролактон) (PCL) [8] и полиуретаны (PU) [9,10]. Волокнистая архитектура таких материалов позволяет воспроизводить отдельные структурные особенности внеклеточного матрикса и создавать поддерживающую среду для адгезии и роста клеток [11,12].

Ключевые структурные характеристики электроформованных матриксов, включая диаметр волокон, общую пористость и размер межволоконных пор, оказывают существенное влияние на адгезию, распределение, пролиферацию и дифференцировку клеток [13,14]. Одним из ограничений электроформованных материалов является затрудненная миграция клеток в толщу матрикса, особенно при плотной упаковке волокон и малом размере межволоконных пор [15,16].

Функциональные свойства электроформованных материалов могут дополнительно регулироваться путем введения биологически активных соединений, лекарственных веществ и других функциональных компонентов. Такие материалы исследуются в качестве раневых покрытий, систем доставки лекарственных веществ, биосенсоров и тканеинженерных конструкций [5,16–23]. Таким образом, сочетание широкого выбора полимеров, возможности управления архитектурой волокнистого материала и введения функциональных компонентов делает электроформование перспективным методом создания биомедицинских материалов с регулируемыми структурными и функциональными свойствами.

1.2 Оборудование и техническая организация процесса электроформования

На процесс электроформования влияют несколько факторов, которые можно разделить на три основные группы: (1) реологические и диэлектрические свойства используемого полимерного раствора, (2) параметры обработки и (3) условия окружающей среды [24,25].

1.2.1 Установка для электроформования волокон

Стандартная установка для электроформования включает высоковольтный источник питания, систему дозированной подачи полимерного раствора или расплава, формирующее сопло и коллектор. По взаимному расположению сопла и коллектора наиболее распространены горизонтальная и вертикальная конфигурации; в последнем случае коллектор может располагаться как ниже, так и выше формирующего сопла (рисунок 1) [26–29]. Выбор геометрии установки определяется свойствами формируемой системы, конструкцией коллектора и требуемой структурой получаемого материала. Кроме того, конфигурация зависит от того, проводится ли процесс электроформования на основе раствора или расплава.

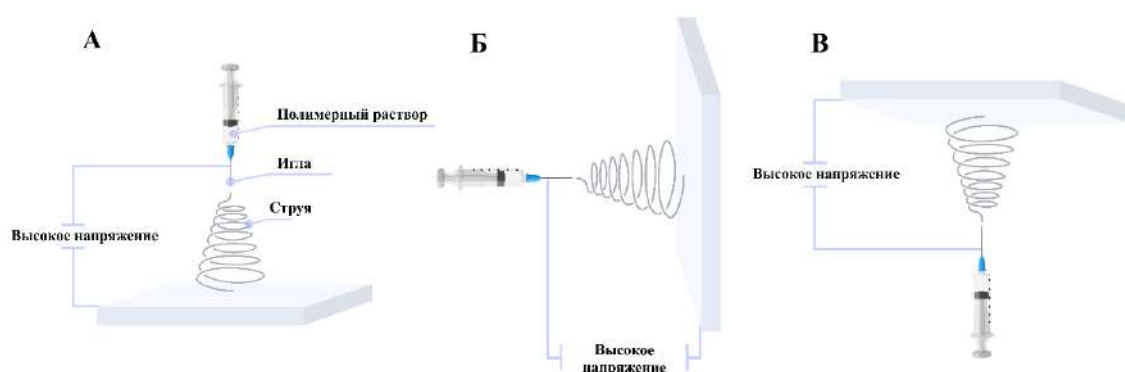


Рисунок 1 – Варианты конфигураций для электроформования: а) вертикальная с коллектором в нижней части установки, б) горизонтальная и в) вертикальная с коллектором в верхней части установки [29]

На иглу подается напряжение от высоковольтного источника питания, что позволяет вытягивать раствор или расплав полимера в тонкие волокна. Для получения более сложных конструкций в области тканевой инженерии вместо обычной иглы можно использовать коаксиальную иглу. Коаксиальная игла состоит из двух или более концентрических игл, образующих конфигурацию «игла в игле», что позволяет создавать волокна типа «ядро–оболочка» или многослойные волокна (подробнее обсуждается в разделе 1.4.3) [30].

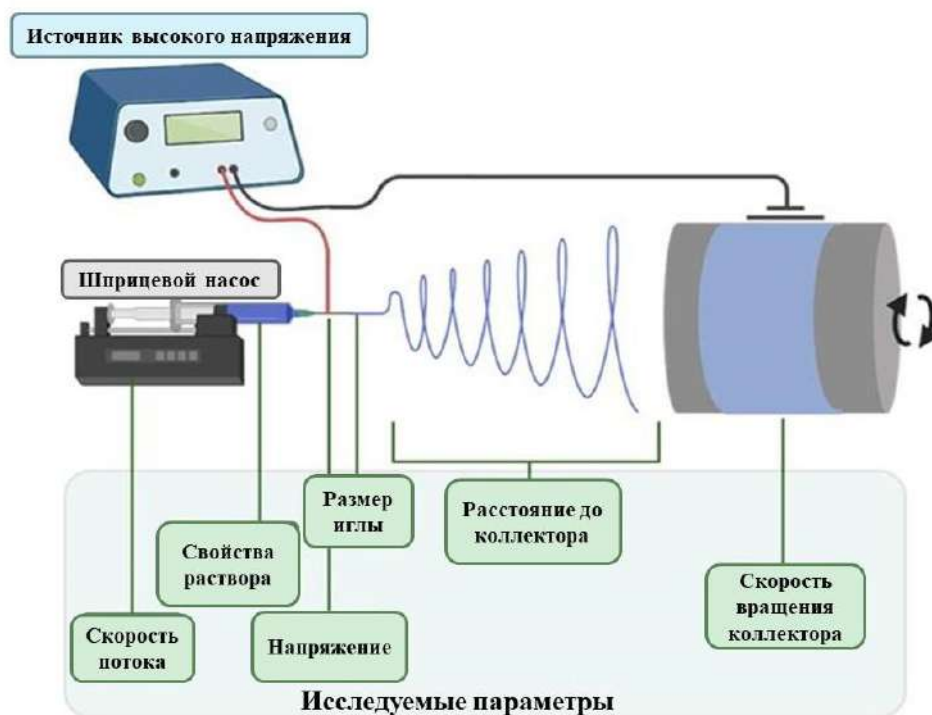


Рисунок 2 – Установка для электроформования с барабанным коллектором [31]

При использовании вращающегося барабана увеличение линейной скорости поверхности коллектора способствует механическому вытягиванию и преимущественной укладке волокон вдоль направления вращения. При достаточно высокой скорости поверхности коллектора может формироваться выражено ориентированная волокнистая структура [31,33]. На рисунке 3 показано, как скорость вращения коллектора влияет на выравнивание волокон [31].

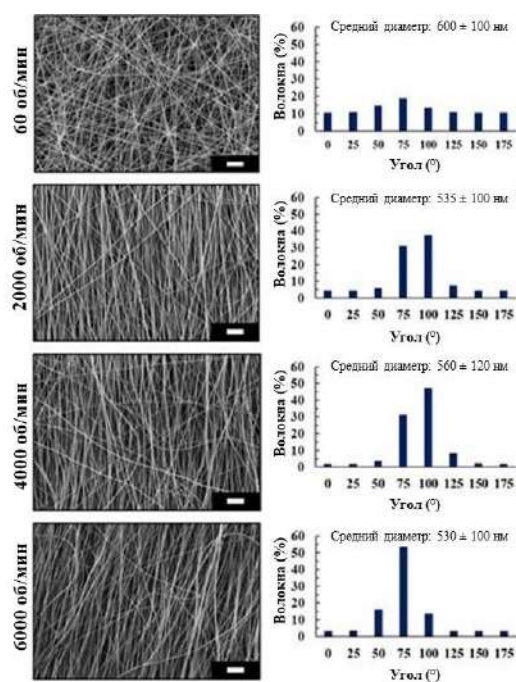


Рисунок 3 – Влияние скорости коллектора на выравнивание волокон (ПС/ДМФ) [31]

1.2.2 Свойства полимерного раствора

На свойства получаемого полимерного матрикса существенное влияние оказывает начальная концентрация полимера в растворе. Увеличение концентрации, как правило, приводит к увеличению диаметра волокон, тогда как недостаточная концентрация может затруднять образование струи из-за недостаточного переплетения полимерных цепей. Поэтому учет как концентрации полимера, так и его молекулярной массы имеет решающее значение для оптимизации характеристик электроформованных волокон [34]. При приготовлении полимерных растворов могут использоваться различные полимерные системы, поэтому необходимо учитывать молекулярную массу и свойства каждого полимера. На рисунке 4 показано влияние молекулярной массы полимера нейлон–6 на свойства волокон [35].

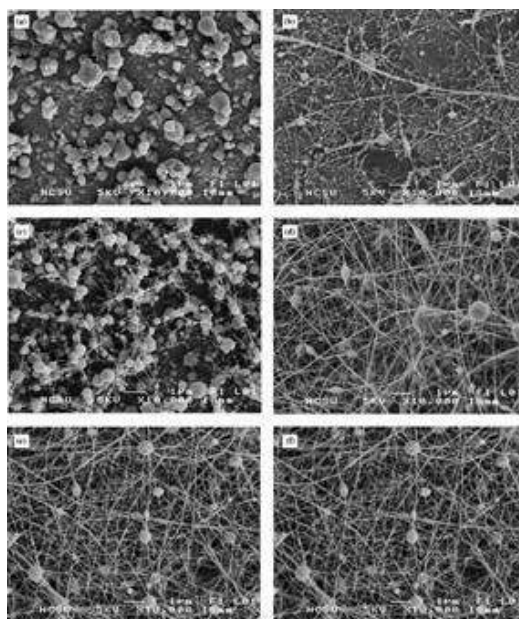


Рисунок 4 – Влияние молекулярной массы и концентрации на морфологию электроформованных волокон. Нейлон–6 с низкой молекулярной массой: 10 мас. % (а) и 15 мас. % (б); нейлон–6 со средней молекулярной массой: 10 мас. % (в) и 15 мас. % (г); нейлон–6 с высокой молекулярной массой: 10 мас. % (д) и 15 мас. % (е) (все образцы при 15 кВ, 15 мкл/мин, 15 см) [35]

Поверхностное натяжение является одним из факторов, определяющих устойчивость струи и морфологию формирующихся волокон. В исследовании Фонг и соавт. [36] изменение поверхностного натяжения сопровождалось изменением диаметра волокон, однако характер этой зависимости определяется также вязкостью, проводимостью, концентрацией полимера и другими параметрами формуемой системы. Например, путем подбора соотношения растворителей и концентрации полимера можно получать пористые полимерные матриксы. Так, Лю и др. использовали смесь растворителей с высоким давлением паров (ДХМ) и низким давлением паров (ДМАК) в соотношении 10:1, успешно создав волокна с улучшенными адсорбционными свойствами за счет увеличенной удельной площади поверхности [37].

Электрическое поле является важным параметром при электроформовании полимерных волокон [38]. Разность электрических потенциалов между электродами, соплом и коллектором приводит к переносу положительных или отрицательных зарядов в зависимости от полярности, приложенной к соплу. Сила, необходимая для вытягивания полимерной струи, определяется главным образом напряженностью и направлением электрического поля, которые связаны с напряжением на сопле и током, протекающим через струю [38]. Направление поля может быть ориентировано как в сторону коллектора, так и от него в зависимости от используемой полярности. В зависимости от типа используемой полярности положительной или отрицательной диаметр волокна может изменяться [39].

Важную роль в процессе электроформования играют электрические свойства полимерного раствора, прежде всего его электропроводность и диэлектрическая проницаемость. Наличие подвижных зарядов обеспечивает электростатическое вытягивание струи, а повышение проводимости в определенном диапазоне обычно способствует увеличению плотности заряда на ее поверхности и более интенсивному растяжению. Однако чрезмерно высокая проводимость также может нарушать стабильность процесса, поэтому влияние этого параметра необходимо рассматривать совместно с вязкостью, поверхностным натяжением и свойствами растворителя [38–45].

Наряду с диэлектрической проницаемостью важным параметром формуемого раствора является его электропроводность. Тан и др. [45] исследовали влияние электропроводности таких растворителей, как ДХМ, ДМФ и пиридин, причем наибольшее значение диэлектрической проницаемости характерно для ДМФ, а наименьшее – для ДХМ. Для изучения влияния электропроводности использовался полимер поли(L–лактид–ко–капролактон) (P(LLA–CL)) (70/30 масс. %) с молекулярной массой (M_w) 150 000 г/моль. В качестве основного растворителя для P(LLA–CL) использовался ДХМ, а ДМФ и пиридин добавлялись для повышения проводимости раствора полимера. Волокна, полученные в смеси P(LLA–CL)/ДХМ, имели наибольший диаметр в диапазоне 160–460 нм; исследователи также отмечают наличие шариков, но подчеркивают, что можно получать волокна без них за счет использования высокомолекулярного полимера. Исследователи утверждают, что с увеличением проводимости полимерного раствора происходило значительное уменьшение диаметра волокон. Для смеси P(LLA–CL)/ДХМ/ДМФ растворители принимались в соотношении 70/30 (мас. %), диаметр волокон составлял 100–380 нм, а для смеси P(LLA–CL)/ДХМ/пиридин в соотношении 50/50 (мас. %) диаметр волокон составлял 50–140 нм. Это связано с тем, что электропроводность определяет распределение плотности заряда на струе и, как следствие, удлинение струи под действием электростатической силы.

1.2.3 Оптимизация параметров электроформования

Параметры процесса электроформования играют решающую роль в формировании конуса Тейлора, а также в определении диаметра волокон, их ориентации и структурной организации. На морфологию волокон существенное влияние оказывают приложенное напряжение, расстояние между соплом и коллектором, скорость подачи раствора и диаметр сопла. Повышение напряжения обычно усиливает электростатическое вытягивание струи, однако его влияние на диаметр волокон не является монотонным и зависит от других параметров процесса [46–48]. Увеличение расстояния между соплом и коллектором может увеличивать время растяжения струи и испарения растворителя, тогда как увеличение скорости подачи раствора, как правило,

приводит к увеличению диаметра волокон и при чрезмерных значениях может способствовать образованию капель или дефектов [48–51].

1.2.4 Влияние условий окружающей среды на электроформование

Температура и относительная влажность окружающей среды могут существенно влиять на испарение растворителя, затвердевание струи, формирование поверхностной пористости и конечный диаметр волокон [52–56]. Характер влияния влажности зависит от природы растворителя и гидрофильности полимера. Изменение содержания водяного пара может влиять как на скорость испарения растворителя, так и на фазовое разделение и затвердевание струи; поэтому повышение влажности в различных системах может приводить как к уменьшению, так и к увеличению диаметра волокон и изменению их поверхностной морфологии.

В ряде систем повышение влажности может изменять поверхностную плотность заряда, характер изгибной неустойчивости струи и кинетику испарения растворителя, что отражается на морфологии формирующихся волокон (рисунок 5) [55,56].



Рисунок 5 – а) Влияние влажности при высокой относительной влажности (ОВ) на скорость испарения струи при электроформовании в зависимости от растворителя. Влияние влажности при высокой относительной влажности (ОВ) на скорость затвердевания струи при электроформовании в зависимости от гидрофильности полимера: б) гидрофильный, в) гигроскопичный и г) гидрофобный [55]

Для гигроскопичных систем повышение влажности может приводить к дополнительной пластификации и изменению кинетики затвердевания струи. При высокой влажности затвердевание волокон замедляется, что позволяет электроформованным струям дольше оставаться в растянутом состоянии. В случае гидрофобного полимера водяной пар может ускорять отверждение волокон по мере повышения влажности (рисунок 6) [55].



Рисунок 6 – Схематическое изображение влияния относительной влажности на диаметр волокна. а) Случай гидрофобных полимеров. б) Случай водорастворимых полимеров в водных системах растворителей и гигроскопичных полимеров, которые при высокой относительной влажности могут пластифицироваться молекулами воды [55]

Температура также оказывает заметное влияние на вязкость, поверхностное натяжение и электропроводность полимерного раствора или расплава [57]. Формирование тонких волокон возможно как при высоких, так и при низких температурах, однако более высокие температуры, как правило, снижают вязкость раствора, облегчая струйный поток и позволяя получать более тонкие волокна. Эти взаимосвязи подчеркивают важность точного контроля температуры для оптимизации процесса электроформования и получения волокон с желаемыми характеристиками [58].

Ян и др. [59] исследовали влияние температуры на процесс образования полимерных волокон в диапазоне температур от 20 до 80 °С. В качестве полимеров для электроформования были выбраны порошки ПАН, растворенные в N,N–диметилацетамиде (ДМАк), и ПВП К90,

растворенный в безводном этаноле. Морфология электроформованных волокон ПАН изменялась с повышением температуры с шероховатой на более гладкую, что обусловлено различной скоростью испарения растворителя (рисунок 7).

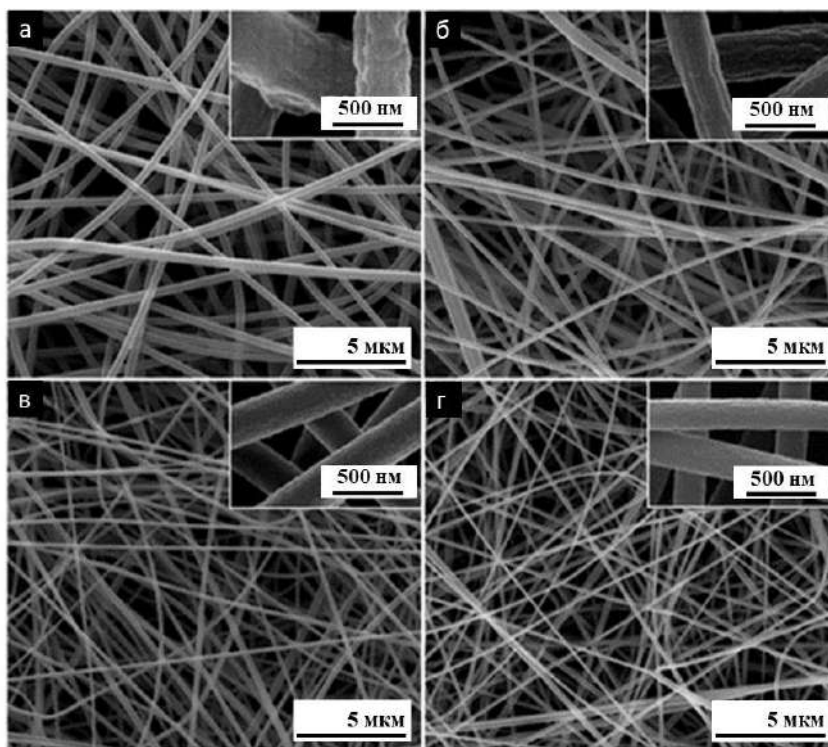


Рисунок 7 – Изображения, подготовленных нановолокон ПАН при различных рабочих температурах, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ). а) F1 – комнатная температура (20 °C), б) F2 –40 °C, в) F3 –60 °C и г) F4 –80 °C. На вставках в правом верхнем углу показаны увеличенные изображения соответствующих волокон ПАН [59]

Диаметр волокон уменьшался с повышением температуры с 530 до 260 нм (рисунок 8). Для PVP K90 ситуация была аналогичной: диаметр волокон также уменьшался с повышением температуры до 40 °C с 830 до 420 нм, тогда как при 50 °C наблюдалось увеличение диаметра до 540 нм. Регулирование рабочей температуры расширяет возможности получения волокон с различными параметрами.

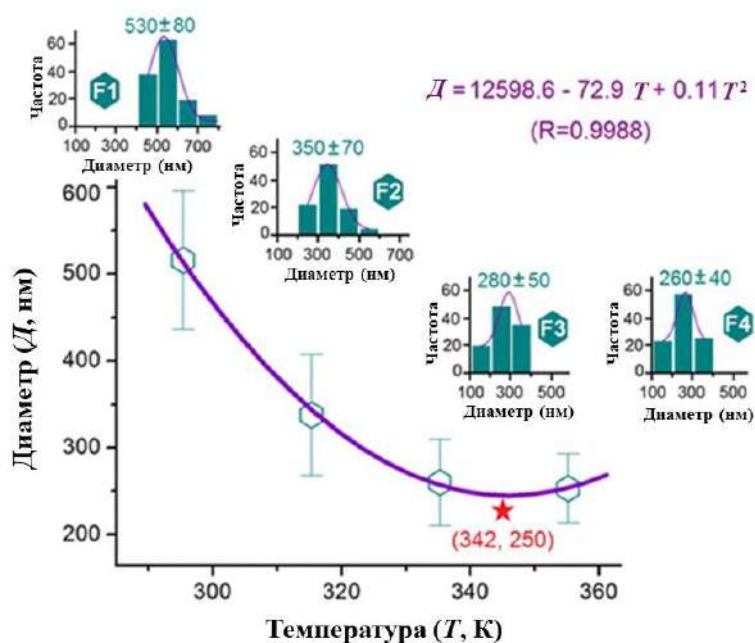


Рисунок 8 – Зависимость между рабочей температурой и диаметрами полученных нановолокон ПАН. На вставках слева вверху –справа внизу представлены статистические результаты для нановолокон ПАН F1, F2, F3 и F4 [59]

1.3 Электроформование

1.3.1 Процесс формирования полимерных волокон

Электроформование представляет собой электрогидродинамический процесс, при котором электрические силы вызывают деформацию и последующее вытягивание полимерного раствора или расплава [60]. Процесс условно можно разделить на несколько последовательных стадий: деформацию капли и формирование конуса Тейлора, инициирование заряженной струи, ее последующее растяжение и истончение с развитием изгибной неустойчивости и, наконец, затвердевание и осаждение волокон на коллекторе (рисунок 9) [61–63].

В отсутствие электрического поля форма капли определяется преимущественно поверхностным натяжением. При повышении напряженности поля электростатические силы деформируют поверхность жидкости, приводя к формированию конуса Тейлора. При достижении критического условия электрические силы преодолевают действие поверхностного натяжения, и из вершины конуса возникает заряженная струя. В процессе движения к коллектору струя подвергается интенсивному растяжению и истончению, сопровождаемому испарением растворителя и развитием характерной изгибной (whipping) неустойчивости.

Для формирования непрерывных волокон существенное значение имеет достаточная степень зацепления полимерных цепей. При недостаточной концентрации полимера капиллярная неустойчивость способствует распаду струи и переходу от электроформования к электрораспылению или образованию волокон с каплевидными дефектами. Для ряда систем

ориентировочное пороговое значение составляет около 2,5 зацеплений на цепь [64], однако конкретное значение зависит от молекулярной массы, концентрации и качества растворителя.

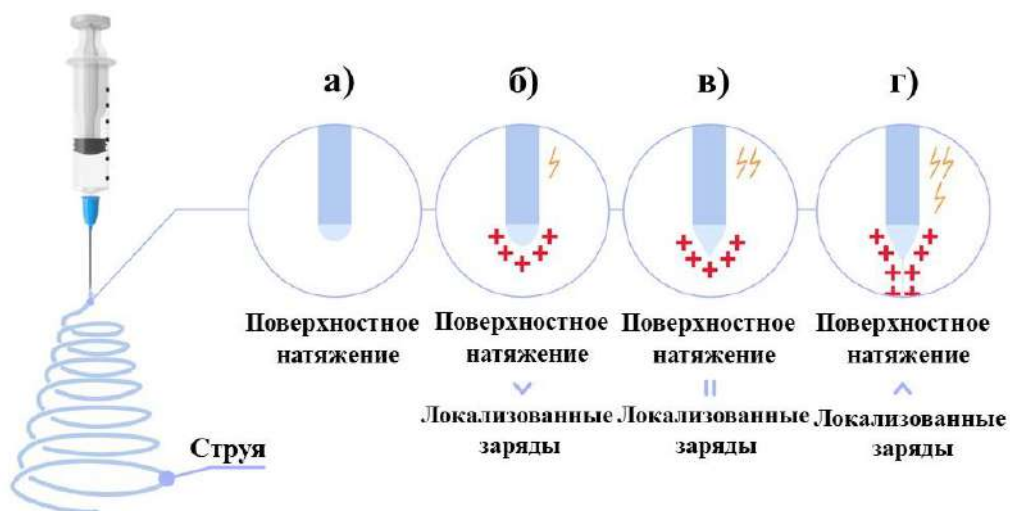


Рисунок 9 – Формирование конуса Тейлора: (а) Капля раствора полимера, принимающая форму под действием поверхностного натяжения; (б) Под действием приложенного напряжения возникают локализованные заряды, растягивающие каплю в конус; (в) Конус Тейлора формируется, когда локализованные заряды уравнивают поверхностное натяжение; (г) Выброс струи происходит, когда заряды преобладают над поверхностным натяжением [29]

Для стабильного электроформования концентрация полимера в растворе должна превышать определенный порог. При превышении критической концентрации степень зацепления цепей становится достаточной для стабилизации струи и происходит электроформование, а не электрораспыление [64]. Эта критическая концентрация, при которой начинают образовываться молекулярные переплетения, обычно пропорциональна отношению молекулярной массы полимера к его эффективному объему [65]. Когда полимерные цепи в растворе превышают эту критическую концентрацию, струя становится стабильной, что позволяет ей удлиняться, растягиваться и истончаться по мере продвижения от кончика конуса к коллектору. В ходе этого процесса волокна перекрывают друг друга на коллекторе, образуя непрерывный полимерный слой [38,46,66].

1.4 Разновидности электроформования

Существует несколько вариантов электроформования, различающихся состоянием исходного полимера, способом подачи компонентов и конструкцией формирующего устройства. К ним относятся электроформование из раствора и расплава, электроформование многокомпонентных систем, коаксиальное и эмульсионное электроформование, а также

различные способы формирования ориентированных волокон. Выбор конкретного подхода определяется свойствами исходной системы и требуемой структурой конечного материала (рисунок 10) [30,67–69].

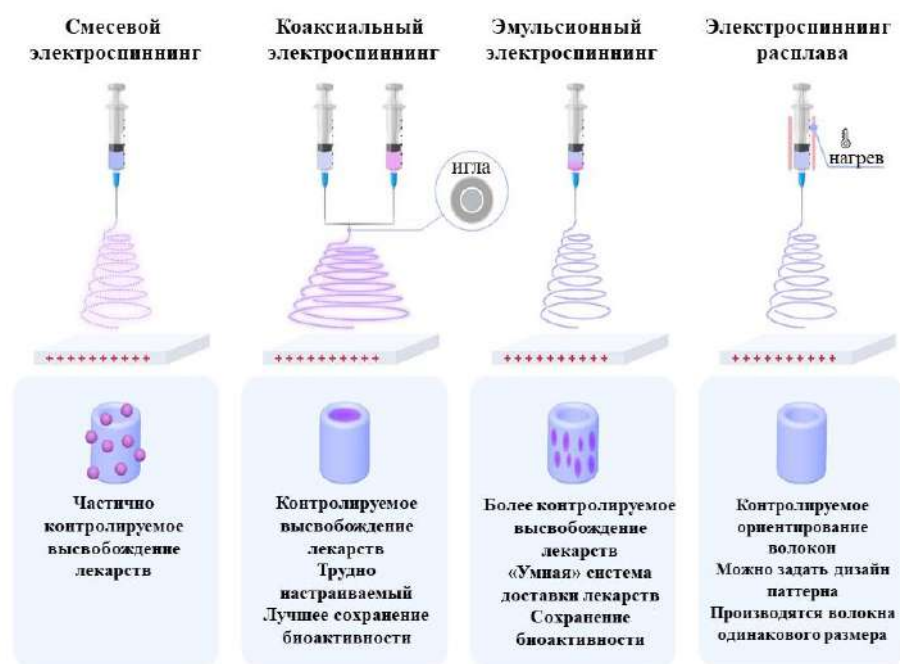


Рисунок 10 – Схематическое изображение традиционных методов электроформования для получения полимерных волокон [29]

1.4.1 Электроформование из расплава

Электроформование из расплава представляет собой вариант метода, при котором исходный полимер переводится в вязкотекучее состояние нагреванием и вытягивается электрическим полем без использования растворителя. Основным преимуществом такого подхода является отсутствие органических растворителей и связанных с ними стадий удаления остаточного растворителя [28]. Вместе с тем высокая вязкость расплава обычно ограничивает степень истончения струи, а повышенная температура затрудняет введение термолabileльных биологически активных компонентов [70–76].

При этом методе расплавленная полимерная масса вытягивается в волокна посредством заряженной струи. Высокая вязкость расплава позволяет точно контролировать струю, что облегчает создание определенных узоров и даже трехмерных структур – это преимущество по сравнению с электроформованием из раствора [70–72]. Для дальнейшего улучшения свойств волокон в полимерный расплав можно вводить добавки, такие как наночастицы [73,74]. Однако

при включении биологически активных компонентов возникают сложности, поскольку высокие температуры могут привести к их деградации [75]. Несмотря на это, включение белков остается возможным для полимеров с низкой температурой плавления [76]. Диаметр волокон, полученных методом электроформования из расплава, обычно колеблется от 0,1 до 5 мкм [77].

1.4.2 Электроформование многокомпонентных систем

Электроформование многокомпонентных систем позволяет объединять полимеры с биологически активными компонентами, включая лекарственные препараты [68,78], вещества растительного происхождения [79,80], аминокислоты [81], неорганические материалы [82] и различные другие добавки. В этом процессе биологически активные вещества или наночастицы растворяются или диспергируются в полимерном растворе, что позволяет инкапсулировать активные компоненты в полимерные волокна для обеспечения контролируемого высвобождения. Данный метод особенно эффективен для доставки низкомолекулярных веществ и, помимо прочего, успешно применяется для инкапсулирования антимикробных пептидов [83].

1.4.3 Коаксиальное электроформование

При коаксиальном электроформовании используются два различных раствора: один формирует сердцевину, а другой – оболочку волокна. Обеспечение оптимальной взаимодополняемости этих растворов имеет решающее значение, особенно в отношении их вязкости, смешиваемости, проводимости и скоростей течения [84]. Коаксиальное сопло, обычно состоящее из двух или более концентрических игл, облегчает этот процесс (рисунок 11) [30]. Раствор для сердцевины подается через внутреннюю иглу, а раствор для оболочки – через внешнюю иглу [85].

Устойчивое формирование волокон типа «ядро–оболочка» требует согласования реологических и электрических свойств растворов сердцевины и оболочки, их межфазной совместимости, скоростей подачи и кинетики испарения растворителей [84–87]. Раствор оболочки должен обладать достаточной вязкоупругостью для формирования непрерывного внешнего слоя, тогда как чрезмерно быстрое или, напротив, недостаточное испарение растворителя может приводить к нарушению морфологии волокна. При использовании летучих растворителей или низких концентраций полимера могут образовываться полые волокна из-за быстрого испарения растворителя сердцевины во время формирования волокна [75,88].

В коаксиальном электроформовании могут использоваться как смешиваемые, так и несмешиваемые растворы [77]. Несмешиваемость растворов может ограничивать взаимную диффузию компонентов сердцевины и оболочки и способствовать сохранению выраженной межфазной границы. В случае смешиваемых растворов все же могут образовываться волокна с

четко различимыми сердцевиной и оболочкой, однако для поддержания эффективного разделения необходимо точно контролировать скорости диффузии и испарения [65].



Рисунок 11 – Схематическое изображение процесса формирования волокон методом коаксиального электроформования [29]

1.4.4 Эмульсионное электроформование

При эмульсионном электроформовании используется многофазная формуемая система, включающая непрерывную и дисперсную фазы. В процессе вытягивания струи и испарения растворителя перераспределение компонентов может приводить к формированию внутренней неоднородности и, при соответствующих условиях, структуры типа «ядро–оболочка» [67]. В отличие от коаксиального электроформования, данный подход не требует специального многоканального сопла. В системах, содержащих водную дисперсную фазу, эмульсионное электроформование может также позволять уменьшить количество используемого органического растворителя [89]. Для стабилизации эмульсии часто применяются поверхностно-активные вещества [90].

1.4.5 Методы получения ориентированных волокон

Стандартный процесс электроформования на плоском или неподвижном барабанном коллекторе дает нетканый мат со случайной укладкой волокон вследствие биения (whipping) неустойчивости заряженной струи. Между тем нервная, скелетно–мышечная, сухожильная и часть сосудистой ткани характеризуются выраженной дифференной анизотропией внеклеточного

матрикса, определяющей анизотропию их механических и функциональных свойств; воспроизведение такой анизотропии на искусственном матриксе –одно из ключевых требований биомиметического подхода в тканевой инженерии [91].

Клетки, контактирующие с топографически структурированной поверхностью, ориентируют цитоскелет, ядро и направление миграции вдоль преобладающей оси рельефа – явление контактного направления (contact guidance). На выровненных волокнах диаметром от десятков нанометров до нескольких микрометров этот эффект выражен особенно отчетливо, поскольку геометрия волокна близка к геометрии фибриллярных структур экстрацеллюлярного матрикса. Наиболее детально контактное направление изучено на модели шванновских клеток: на выровненных матах поли-ε-капролактона (ПКЛ) клетки не только элонгируются и мигрируют вдоль оси волокон, но и демонстрируют признаки ускоренного созревания – повышение экспрессии позднего миелин-специфичного маркера P0, отсутствующее на неориентированных матриксах [91]. Топографическая анизотропия модулирует и фенотип макрофагов: на выровненных нановолокнах поли(L-лактид-ко-ε-капролактона) чаще формируется провосстановительный (M2) фенотип, а число шванновских клеток и аксонов в зоне дефекта седалищного нерва при использовании выровненных волокон в 2,0–2,84 раза выше, чем при использовании неориентированных [92].

Таким образом, ориентация волокон одновременно обеспечивает биологический сигнал направленного роста и дифференцировки клеток и формирует анизотропию механических характеристик каркаса. Разработанные подходы к получению ориентации делятся на несколько основных групп: механические методы на основе подвижных коллекторов; электростатические методы, основанные на модификации конфигурации поля в зоне сбора (параллельные электроды, магнитное поле, вспомогательные электроды); методы постобработки нетканых материалов одноосным вытягиванием. Эти подходы рассмотрены далее последовательно, с сопоставлением достигаемой степени ориентации, механизма действия и ограничений.

1.4.5.1 Вращающиеся коллекторы

Исторически первым и наиболее распространенным способом получения ориентированных волокон стало применение вращающегося цилиндрического барабана. Механизм ориентации носит преимущественно механический характер: если линейная скорость поверхности коллектора приближается к скорости осаждения струи, волокно наматывается на барабан практически без завершения полного цикла изгибной неустойчивости, что дает преимущественно тангенциальную укладку. При скорости значительно ниже критической, волокна укладываются хаотично; при скорости, близкой к критической, степень выравнивания

резко возрастает, однако при ее превышении происходит разрыв струи вследствие чрезмерного натяжения, что ограничивает диапазон рабочих скоростей и производительность процесса [93].

Систематическое сопоставление вклада диаметра барабана и скорости вращения показало, что диаметр коллектора является более значимым фактором, определяющим степень выравнивания и диаметр волокна, чем скорость вращения как таковая: увеличение диаметра барабана при постоянной угловой скорости дает больший прирост линейной скорости поверхности и, соответственно, более выраженную ориентацию, чем эквивалентное по эффекту увеличение оборотов при малом диаметре [94]

Существенное ограничение барабанных коллекторов – неоднородность ориентации по толщине мата: волокна первых стадий осаждения испытывают максимальное натяжение и ориентируются наиболее эффективно, тогда как по мере роста толщины мата экранирующее действие уже осевших волокон снижает локальную напряженность поля и относительную линейную скорость для новых волокон, что снижает степень их ориентации в верхних слоях [93]. Помимо сплошного барабана применяются его модификации, вращающийся диск с острой кромкой, концентрирующей силовые линии поля, и вращающийся проволочный барабан.

1.4.5.2 Электроформование в магнитном поле

Альтернативным подходом является использование магнитного поля в области движения и осаждения струи. Было показано, что размещение постоянных магнитов вблизи зоны сбора может изменять траекторию и устойчивость заряженной струи и способствовать преимущественному ориентированию волокон [95]. Конкретный механизм такого воздействия определяется геометрией электрического и магнитного полей и свойствами формируемой системы. При введении суперпарамагнитных наночастиц, например Fe_3O_4 , дополнительно возникают магнитные силы, действующие непосредственно на дисперсную магнитную фазу и способствующие ориентации струи и формируемых волокон [96].

1.4.5.3 Коллекторы из параллельных электродов и разнесенных лезвий

Одним из альтернативных подходов получения выровненных волокон является использование параллельных проводящих электродов (или парой лезвий), разнесенных на определенный зазор. Заряженная струя, приближаясь к зазору между двумя электродами, испытывает электростатическое притяжение к обоим краям одновременно, вследствие чего волокно «перекидывается» через зазор и фиксируется в натянутом состоянии, ориентируясь перпендикулярно линии электродов; последовательное формирование множества таких волокон дает массив параллельно ориентированных нитей [97].

Степень выравнивания и средний диаметр волокон определяются в первую очередь зазором между электродами и шириной электродных пластин: увеличение зазора совместно с увеличением ширины пластин повышает степень выравнивания, а уменьшение плотности заряда и расстояния от иглы до коллектора также способствует более выраженной ориентации [98].

Преимущество коллекторов данного типа – отсутствие контакта волокна с движущейся поверхностью, что снижает механическое повреждение, и возможность формирования свободновисящего материала. Использование пары отрицательно заряженных параллельных пластин без физической подложки между ними («gap electrospinning») при оптимизированных свойствах раствора позволяет получить непрерывно ориентированные волокна длиной до 125 см за счет многократного «перебрасывания» струи через протяженный зазор [99].

1.4.5.4 Постформовочное вытягивание матриксов для ориентирования волокон

Также стоит отметить, что получение ориентированной структуры возможно не только с использованием модификации самого процесса электроформования, а еще и в постобработке уже сформированного волокнистого полимерного матрикса одноосным вытягиванием.

Исследования показывают, что аморфные матриксы на основе ПЛА, помещенные в этанол, приобретают выраженную пластичность: относительное удлинение при разрыве возрастает с ~ 50 % на воздухе до ~ 280 % в этаноле. Степень структурной реорганизации ПЛА при деформации зависит от условий обработки, исходного структурного состояния материала, степени вытяжки и продолжительности контакта с растворителем. Поэтому пластификация и ориентация аморфных цепей не обязательно сопровождаются заметным увеличением общей кристалличности, хотя при других условиях деформация может инициировать кристаллизацию или полиморфные превращения. Полученные вытягиванием в этаноле ориентированные матриксы обеспечивали контактное направление роста кератиноцитов человека (линия HaCaT) без ухудшения жизнеспособности и пролиферации клеток по сравнению с неориентированными матами [100] что подтверждает биологическую функциональность такого способа ориентации.

Механизм действия низкомолекулярных спиртов на аморфный полилактид при температурах ниже температуры стеклования (T_g) (составляющей приблизительно 55–60 °C) связан с их проникновением в межцепное пространство и локальным экранированием сегментальных взаимодействий, что снижает эффективную T_g в набухшем состоянии и обеспечивает молекулярную подвижность, достаточную для пластической деформации без разрушения волокон. Это принципиально отличается от вытягивания на воздухе при комнатной температуре, когда полимер находится заметно ниже T_g и склонен к хрупкому разрушению. Родственные явления описаны для объемного застеклованного полилактида: обработка растворителями, вызывающими крейзинг, инициирует холодную кристаллизацию полимера

непосредственно в ходе деформации за счет локальной подвижности цепей в зоне развивающихся крейзов [101]; температура и продолжительность контакта с растворителем определяют степень и характер формирующейся кристаллической фазы по данным рентгеновской дифракции [102].

Помимо пластифицирующего эффекта в электроформованных матриксах ПЛА реализуется ориентационная (деформационно–индуцированная) кристаллизация: при растяжении цепи полимера в аморфных областях выстраиваются вдоль оси приложенного напряжения, что приводит к зарождению и росту кристаллитов, ориентированных цепной осью вдоль оси волокна. Показано, что вытягивание индуцированное ориентацией способно вызывать переход между полиморфными модификациями решетки ПЛА –из α –формы в пьезоэлектрически активную β –форму, для которого в объемных образцах традиционно требуются отдельные стадии отжига и растяжения, тогда как в электроформованных нановолокнах высокая молекулярная ориентация, достигнутая уже при сборе, может обеспечивать частичный переход к β –фазе без дополнительной термообработки [103].

1.5 Полимеры, используемые в электроформовании для целей тканевой инженерии

Полимеры, используемые для получения электроформованных матриц тканеинженерного назначения, условно подразделяют на природные и синтетические. Природные полимеры, включая белки и полисахариды, обладают высокой биологической активностью и содержат функциональные группы, способные участвовать во взаимодействии с клетками, однако их механические характеристики и технологичность при электроформовании часто ограничены. Синтетические полимеры, напротив, позволяют в широких пределах регулировать молекулярную массу, механические свойства, скорость деградации и условия переработки. Поэтому при создании тканеинженерных матриц широко используются как индивидуальные полимеры, так и многокомпонентные системы, сочетающие технологические преимущества синтетического полимера с функциональными свойствами природного компонента [104].

1.5.1 Применение природных и растительных полимеров в электроформовании для целей тканевой инженерии

Природные полимеры представляют интерес для тканевой инженерии благодаря их химическому сходству с компонентами внеклеточного матрикса, наличию функциональных групп, обеспечивающих взаимодействие с клетками, и способности к биodeградации. Вместе с тем их непосредственное электроформование может быть затруднено вследствие недостаточной цепной зацепленности, высокой гидрофильности или ограниченных механических свойств,

поэтому они часто используются в смесях с синтетическими полимерами или после химической модификации [105].

1.5.1.1 Фиброин шелка

Фиброин шелка – это природный белковый полимер с исключительными свойствами, который традиционно получают из коконов насекомых, преимущественно из коконов шелкопряда (*Bombyx mori*) [106]. Его биосовместимость, биоразлагаемость, высокая механическая прочность и низкая иммуногенность делают его чрезвычайно универсальным материалом для различных биомедицинских применений, таких как сосудистые трансплантаты [107–109], раневые повязки [110,111], хирургические нити [112] и другие медицинские цели. В рамках текущих исследований продолжается изучение возможностей модификации шелкового фиброина, в частности в области разработки композитных материалов, сочетающих фиброин с другими биосовместимыми полимерами или биологически активными добавками для повышения функциональности [113,114]. Например, было показано, что включение гидроксиапатита в фиброиновые матриксы улучшает остеоинтеграцию костных имплантатов [115], в то время как добавление наночастиц серебра придает антибактериальные свойства, предотвращающие инфекции на поверхностях биоматериалов [116].

В исследовании Phamornnak и др. [117] были разработаны двухслойные электроформованные фиброиновые матриксы с выровненным верхним слоем и хаотично ориентированным нижним слоем. Исследования с использованием гибридной клеточной линии NG108–15 продемонстрировали, что эти матриксы являются биосовместимыми, усиливают метаболическую активность и стимулируют рост аксонов, что подчеркивает их потенциал в инженерии нервной ткани.

1.5.1.2 Коллаген

Коллаген, являющийся основным компонентом внеклеточного матрикса (ВКМ), – самый распространенный белок в тканях человека и животных, играющий ключевую роль в поддержании структурной целостности [118]. Его низкая антигенность, превосходная биосовместимость и биоразлагаемость способствуют пролиферации клеток и регенерации тканей [119–122]. Источники коллагена разнообразны, в том числе кожа крупного рогатого скота, сухожилия [123] и ткань мочевого пузыря свиней [124], что делает его легкодоступным как для научных исследований, так и для практического применения. Биоматериалы на основе коллагена широко используются в тканевой инженерии, в частности в таких областях, как лечение ожогов, заживление ран [125–127] и инженерия костной ткани [128,129].

В исследовании Гарсии–Эрнандеса и др. [130] были изготовлены электроформованные полимерные матриксы из смеси ПВА (поливинилового спирта), ХК (коллагена) и ЭЭХП (этанольного экстракта зверобоя). Эти матриксы обладали оптимальной пористостью (67–90 %), необходимой для поддержки роста, взаимодействия и пролиферации клеток. Кроме того, волокнистые матриксы продемонстрировали значительную антимикробную активность в отношении *S. aureus*, что указывает на их потенциал для применения в заживлении ран и регенерации тканей.

1.5.1.3 Желатин

Желатин – биополимер, получаемый в результате частичного кислотного или щелочного гидролиза коллагена из таких источников, как кожа, белые соединительные ткани и кости [131], – относится к категории производных белков, поскольку в чистом виде в природе не встречается и получается путем гидролиза [132]. Желатин известен своими ключевыми свойствами: биосовместимостью, биоразлагаемостью и низкой токсичностью, которые способствуют пролиферации клеток. Кроме того, он обычно характеризуется относительно низкой иммуногенностью, что делает его пригодным для применения в биомедицине [133]. Несмотря на эти преимущества, желатин термически нестабилен, что может ограничивать его применение.

Желатин можно использовать для изготовления гидрогелей и нановолокон, которые способствуют прикреплению, пролиферации и дифференцировке клеток, что открывает перспективные возможности для регенерации кожи, костей, хрящей и даже нервных тканей [134–136]. Одним из новых направлений применения является инженерия нервных тканей – область, вызывающая растущий интерес.

В исследовании Ахмади и др. [136] были оценены эффекты матриксов из поли(ε–капролактона) (ПКЛ)/желатина (Gel) с включением слоистых двойных гидроксидов (LDH) на клетки нейробластомы человека SH–SY5Y. Исследование показало, что состав матриксы значительно улучшал прикрепление и пролиферацию клеток. Через три дня после посева на матриксах наблюдался заметный рост нейронов; их микроструктура была схожа с микросредой внеклеточного матрикса (ECM) и способствовала миграции и пролиферации клеток (рисунок 12) [136].

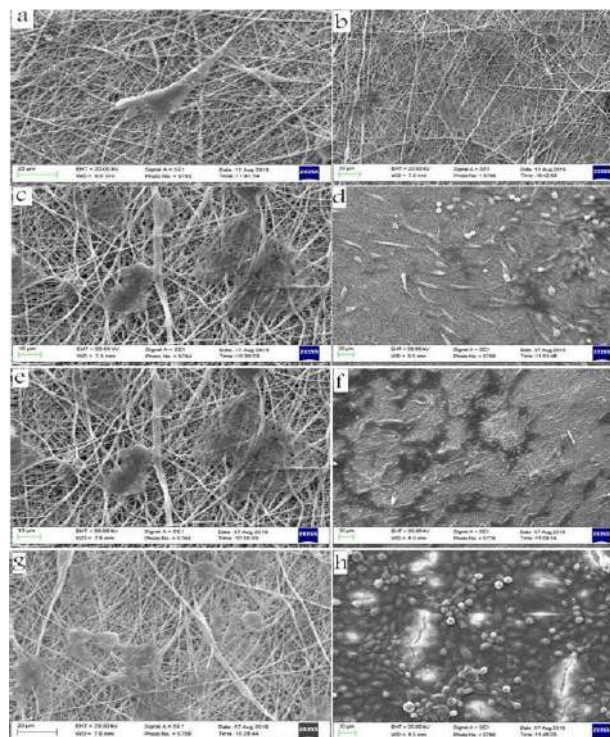


Рисунок 12 – Микрофотографии, клеток нейробластомы SH-SY5Y, культивированных на электроформованных матриксах в течение 1 и 3 дней, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ). (a, b) ПКЛ/Gel, (c, d) ПКЛ/Gel с 0,1 % LDH, (e, f) ПКЛ/Gel с 1 % LDH и (g, h) ПКЛ/Gel с 10 % LDH [136]

1.5.1.4 Хитозан

Хитозан – линейный полукристаллический полисахарид, получаемый в результате деацетилирования хитина [137], второго по распространенности биополимера после целлюлозы. Хитин обычно получают из экзоскелетов ракообразных, насекомых и некоторых видов грибов [138]. Хитозан обладает ограниченной растворимостью в нейтральных и щелочных условиях и нерастворим в большинстве органических растворителей [139]. Хитозан обладает множеством преимуществ, включая широкую доступность, гидрофильность, биосовместимость, биоразлагаемость и нетоксичность [139–142]. Это объясняет почему он представляет интерес для создания биологически активных материалов, используемых в тканевой инженерии, например, для выращивания костной, сосудистой и кожной тканей [143–145].

Эффективность применения хитозана в тканевой инженерии можно значительно повысить за счет его комбинирования с другими материалами, что позволяет улучшить как его биоактивные, так и механические свойства. Одним из успешных примеров является сочетание шелкового фиброина с хитозаном, которое способствует усилению пролиферации клеток и их адгезии к матриксам [144]. Кроме того, системы на основе хитозана, содержащие

наногидроксиапатит и полиэтиленгликоль, продемонстрировали заметное повышение механической прочности, способствуя регенерации костной ткани [146].

В исследовании Пезешки–Модаррес и др. [147] были оценены матриксы на основе желатина и хитозана (Chi) в соотношениях 100/0, 70/30, 60/40 и 50/50 с использованием фибробластов кожи человека (HDF). Оценки *in vitro* продемонстрировали биосовместимость, адгезию, дифференцировку и пролиферацию для всех составов матриксов. Результаты окрашивания DAPI подтвердили эффективное прикрепление клеток и пролиферативную активность на всех исследованных матриксах (рисунок 13) [147].

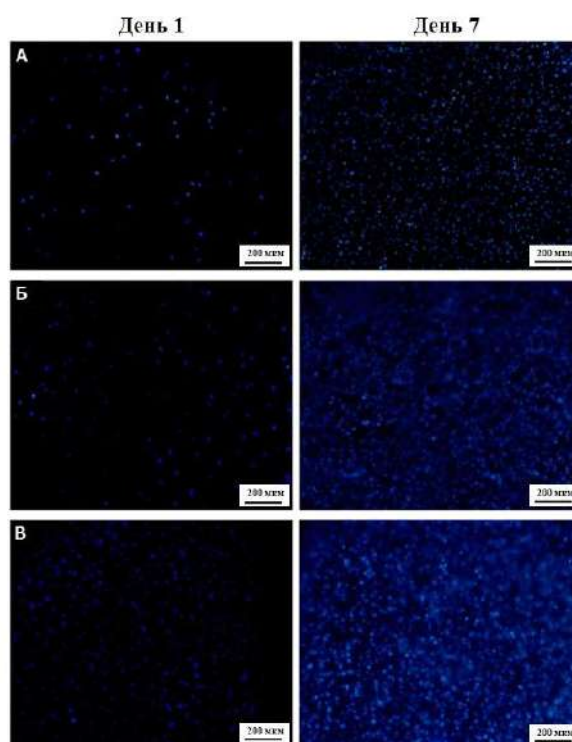


Рисунок 13 – Окрашивание клеток HDF на электроформованном желатиново-хитозановом матриксе (окрашивание DAPI) через 1 и 7 дней культивирования. (a) Chi 50; (b) Chi 40; (c) Chi 30 [147]

Как показано на рисунке 14, количество клеток на всех полимерных матриксах стабильно увеличивалось в течение 14-дневного периода культивирования. На 7-й и 14-й дни матриксы Chi 30 и Chi 40 продемонстрировали наибольшую пролиферацию клеток, тогда как образец без хитозана (Chi 0) показал наименьшую скорость пролиферации.

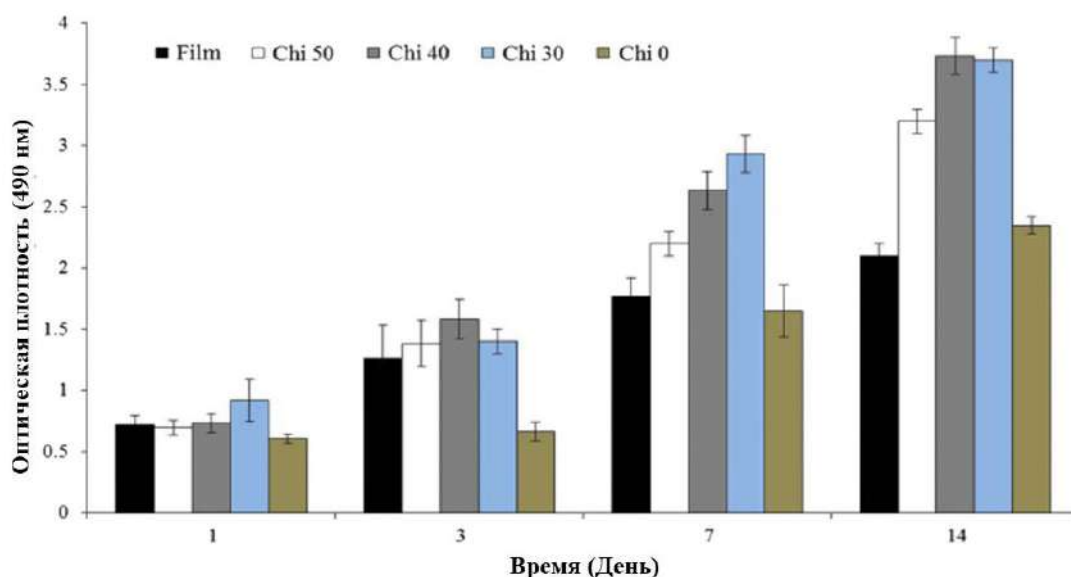


Рисунок 14 – Анализ MTS после культивирования клеток HDF на нановолоконных матриксах. Поглощение формазана, выраженное в зависимости от времени культивирования [147]

Авторы сообщили, что диаметр волокон матрицы составлял от 180 до 196 нм, пористость –92 %, а прочность на разрыв –1,1 МПа. Результаты анализа MTS показали, что присутствие хитозана положительно влияло на культуры клеток HDF. Основываясь на этих данных и механических свойствах матриксов, авторы высказали предположение, что материал на основе желатина и хитозана (70/30) является весьма перспективной для применения в тканевой инженерии [147].

1.5.1.5 Альгинат и его производные

Альгинат – это природный полисахарид, ценный за биосовместимость, гелеобразующую способность, стимулирование пролиферации клеток, нетоксичность, биоразлагаемость, высокую абсорбционную способность и простоту обработки [148]. Его получают преимущественно из бурых водорослей, таких как ламинария (*Laminaria*), саргассум (*Sargassum*) и лессония (*Lessonia*), а также из некоторых бактерий, например *Azotobacter* и *Pseudomonas* [149,150]. В водорослях альгинат обычно встречается в виде солей кальция, магния и натрия.

Для повышения его эффективности исследователи разработали различные композиты на основе альгината. Например, Ван и др. [151] синтезировали альгинат натрия с различными степенями окисления для улучшения прядильности при электроформовании, добавив наночастицы оксида цинка, чтобы создать волокнистые мембраны с оптимизированной морфологией, механическими свойствами и биосовместимостью. Мембраны, содержащие до 3 % наночастиц оксида цинка, проявляли антибактериальную активность в отношении *E. coli* и *S.*

aureus in vitro, снижали воспалительные реакции и способствовали образованию грануляционной ткани [151].

В последнее время в исследованиях все больше внимания уделяется разработке полимерных композитов, направленной на улучшение функциональных характеристик биоматериалов. Хаджиаббас и др. [152] создали матрикс, состоящий из окисленного альгината (OAL), желатина (G) и шелкового фиброина (SF), который обеспечивал подходящую пористость и структуру для адгезии и распределения мезенхимальных стволовых клеток (AMSC) внутри матрикса. Оба матрикса OAL–G и OAL–G–SF были нетоксичными и эффективно стимулировали пролиферацию AMSC.

1.5.1.6 Гиалуроновая кислота и ее соли

Гиалуроновая кислота (ГК) представляет собой линейный несulfатированный гликозаминогликан, построенный из повторяющихся дисахаридных звеньев D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных β -1,3- и β -1,4-гликозидными связями [153,154]. Наличие карбоксильных групп определяет полиэлектролитный характер ГК и ее высокую гидрофильность. В физиологических условиях ГК преимущественно находится в ионизованной форме; в биомедицинских материалах широко используются также ее соли, в частности гиалуронат натрия.

ГК является естественным компонентом внеклеточного матрикса и участвует в регуляции клеточной адгезии, миграции и пролиферации, в том числе посредством взаимодействия с рецепторами CD44 и RHAMM [153–158]. Эти свойства делают ее перспективным функциональным компонентом волокнистых матриксов.

Вместе с тем высокая гидрофильность и полиэлектролитный характер ГК затрудняют ее непосредственное совместное электроформование с гидрофобными алифатическими полиэфирами. Одним из подходов к совмещению таких компонентов является эмульсионное электроформование, при котором водный раствор ГК диспергируется в органической фазе, содержащей растворенный полимер, а стабилизация межфазной границы обеспечивается поверхностно-активным веществом. В процессе формирования и затвердевания струи происходит перераспределение компонентов, в результате которого гидрофильная фаза может локализоваться внутри или в отдельных доменах полимерного волокна.

Показано, что эмульсионное электроформование позволяет совмещать гидрофобные полиэфиры с ГК и другими гидрофильными биополимерами и получать многокомпонентные волокнистые матриксы [159]. Таким образом, использование гиалуроната натрия в сочетании с ПАВ представляет интерес не только с точки зрения биологической функционализации

материала, но и как фактор, способный существенно изменять морфологию, межфазную организацию и механические свойства формируемых волокон.

1.5.2 Применение синтетических полимеров в электроформовании для тканевой инженерии

Синтетические полимеры широко используются при создании электроформованных матриц благодаря воспроизводимому химическому составу и возможности регулирования молекулярной массы, механических характеристик, кристалличности и скорости деградации. Среди биоразлагаемых синтетических полиэфиров особое значение имеют полилактид и поли(ϵ -капролактон), широко исследуемые для тканевой инженерии и систем доставки лекарственных веществ.

1.5.2.1 Полимолочная кислота (ПЛА)

Полилактид (ПЛА) представляет собой биоразлагаемый термопластичный алифатический полиэфир, получаемый из молочной кислоты или посредством полимеризации лактида [160]. Деградация ПЛА в водной и физиологической среде происходит преимущественно вследствие гидролиза сложноэфирных связей с последовательным снижением молекулярной массы и образованием низкомолекулярных олигомеров и молочной кислоты [161]. Образующийся лактат может включаться в нормальные метаболические пути организма. Стереохимия ПЛА определяется конфигурацией исходных лактидных звеньев; наиболее распространены поли(L-лактид) (PLLA), поли(D-лактид) (PDLA) и материалы, содержащие различное соотношение L- и D-звеньев. Стереорегулярность существенно влияет на способность ПЛА к кристаллизации и, следовательно, на его термические, механические и деградационные свойства [162].

Для электроформования ПЛА применяются как индивидуальные растворители, включая дихлорметан, гексафторизопропанол, хлороформ и тетрагидрофуран, так и их смеси [163–168]. Природа растворителя влияет не только на растворимость полимера, но и на вязкость, электропроводность, поверхностное натяжение и кинетику испарения формируемой струи. В смесях растворителей различие в летучести компонентов может вызывать фазовое разделение в процессе затвердевания струи и способствовать формированию поверхностной и внутренней пористости волокон [168–170]. Так, Инь и др. успешно получили пористые волокна ПЛА с использованием смеси CF/ДМФ в соотношениях 90/10 и 80/20 [168]. Таким образом, для ПЛА выбор системы растворителей является одним из ключевых инструментов управления морфологией волокон и структурой электроформованного матрикса, что обосновывает систематическое исследование этого фактора в настоящей работе.

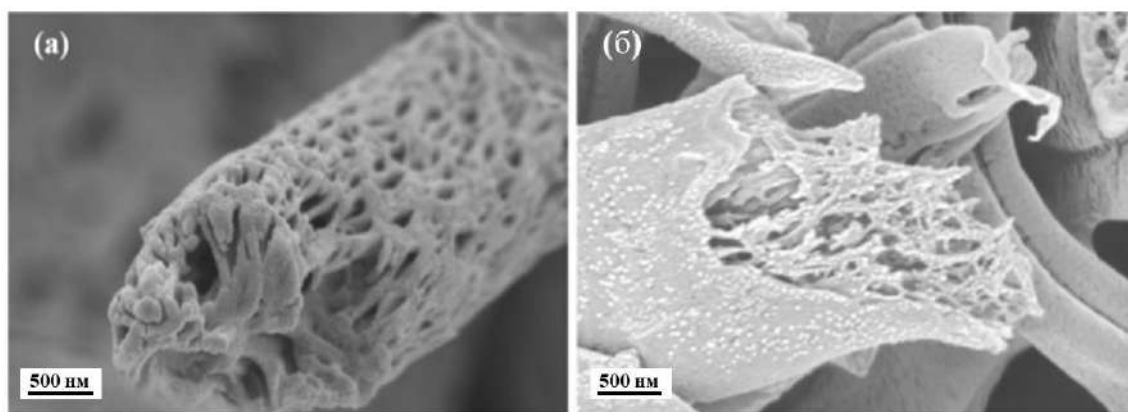


Рисунок 15 – Изображения поперечных сечений чистых волокон ПЛА, полученных с использованием CF/ДМФ с массовым соотношением 90/10 (а), 80/20 (б) [168]

ПЛА широко используется в различных областях медицины, включая системы доставки лекарственных средств [171], челюстно–лицевую хирургию [172,173] и тканевую инженерию [174]. Недавние исследования были посвящены разработке композитных матриц. Например, Самохин и др. [175] исследовали включение полиэтиленгликоля (ПЭГ) в нановолоконные мембраны, состоящие из ПЛА/хитозана, изготовленные методом электроформования. Добавление ПЭГ привело к получению более тонких волокон с пониженной поверхностной пористостью, а также к повышению метаболической активности в высеванных клетках, что свидетельствует об усилении гидрофильности матриц [175]. Аналогичным образом Абдулла и др. [176] использовали коаксиальные электроформованные волокна для частичной замены костной ткани, причем в качестве сердцевины выступал ацетат целлюлозы (СА), а в качестве оболочки – ПЛА. Коаксиальные волокна продемонстрировали большую прочность и жесткость по сравнению с чистыми волокнами СА. Путем регулирования скорости потока удалось успешно изготовить волокна без дефектов. Испытания *in vitro* выявили превосходное распределение и прикрепление остеобластов человека на матриксе, а также более высокую пролиферацию клеток по сравнению с чистыми волокнами ПЛА и смешанными волокнами ПЛА/СА [176].

Полимерные матрицы, состоящие из сополимеров полимолочной и гликолевой кислот (PLGA), были использованы Стахевич и др. [177] для оценки биосовместимости с остеобластоподобными клетками, в том числе линиями MC3T3–E1 и UMR106. Результаты показали, что экспрессия генов клеток UMR106, культивируемых на волокнах PLGA, была сопоставима с таковой у клеток, выращенных на традиционных пластиковых субстратах, что свидетельствует о сохранении их фенотипических характеристик. Кроме того, в ходе исследования было установлено, что хаотично ориентированные полимерные волокна

способствуют миграции клеток за счет повышенной пористости, обусловленной наличием свободного пространства между волокнами.

1.5.2.2 Поли(ϵ -капролактон) (PCL)

Поли(ϵ -капролактон) (PCL) – это полукристаллический алифатический полиэстер с кристалличностью до 50 %, получаемый в результате полимеризации ϵ -капролактона с раскрытием цикла. К его основным свойствам относятся биосовместимость, высокая механическая прочность и биоразлагаемость [178,179]. PCL широко используется в тканевой инженерии [180,181], системах доставки лекарственных средств [182–185] и при регенерации костной ткани [186], а также в других областях.

Для получения нановолокон и минимизации образования шариков Ли и др. [187] добавили воду в раствор PCL в ледяной уксусной кислоте. Вода повысила проводимость раствора и ионизировала уксусную кислоту, что привело к образованию ультратонких волокон. Доля волокон диаметром 500 нм уменьшалась по мере увеличения содержания воды, а при концентрации воды 9 % волокна стали более однородными [186].

Исследования по образованию пор в волокнах находятся в центре внимания многих научных групп. Например, Кацоганнис и др. [188] изучали влияние различных растворителей, в том числе хлороформа, дихлорметана, тетрагидрофурана (ТГФ) и муравьиной кислоты (МК). Эти растворители были признаны оптимальными для получения растворов ПКЛ, пригодных для электроформования. Хлороформ и дихлорметан были предпочтительны благодаря низким температурам кипения, в то время как смешиваемость ТГФ с водой и высокая диэлектрическая проницаемость МК способствовали их пригодности. Кроме того, для обеспечения хорошего фазового разделения использовался диметилсульфоксид (ДМСО), обладающий низкой скоростью испарения. Исследование показало, что образовывались поры различных размеров и глубин, при этом диаметр волокон значительно варьировался. Увеличение концентрации ДМСО привело к уменьшению диаметра волокон с 2270 нм до 1470 нм, что соответствовало увеличению проводимости раствора с 0,42 до 0,67 мкСм/см. Однако преимущества ДМСО проявлялись только при концентрациях от 10 % до 20 %. При концентрациях, превышающих 30 %, образовывались лентообразные волокна, а поры исчезали [188].

Гао и Калланан [189] исследовали матрицы на основе PCL для клеток печени HepG2, создавая волокна с различной морфологией поверхности с использованием разных комбинаций растворителей. Полученные волокна имели углубления или поры на поверхности, что существенно влияло на жизнеспособность клеток и содержание ДНК (рисунок 16).

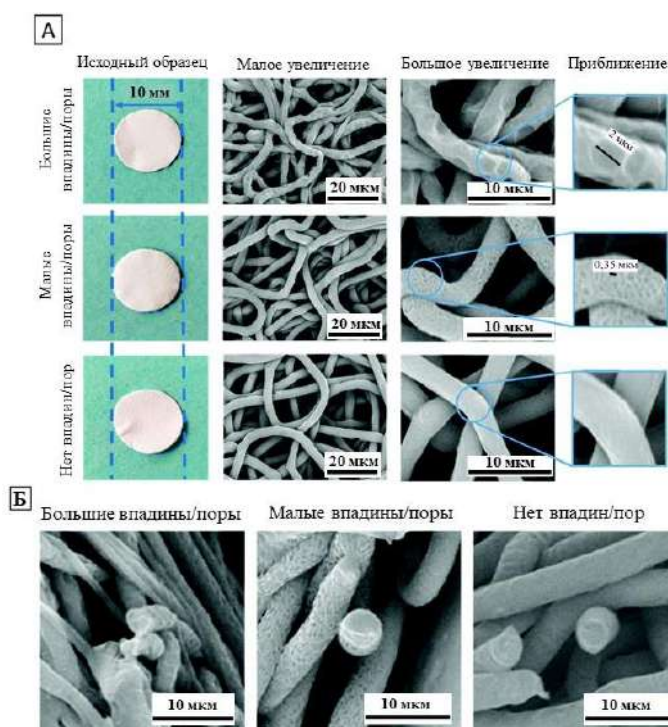


Рисунок 16 – Изображения, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ), показывают, что матриксы из PCL, полученные методом электроформования, обладают разнообразной топографией поверхности (А); изображения поперечных сечений, полученные с помощью СЭМ, демонстрируют волокна с выраженными, незначительными и отсутствующими поверхностными углублениями (В) [189]

Клетки печени НерG2 продемонстрировали оптимальную жизнеспособность и уровни ДНК на матриксах с небольшими углублениями или порами на поверхности (рисунок 17). Данное исследование подчеркивает потенциал полимерных матриксов для разработки платформ, имитирующих печеночную ткань.

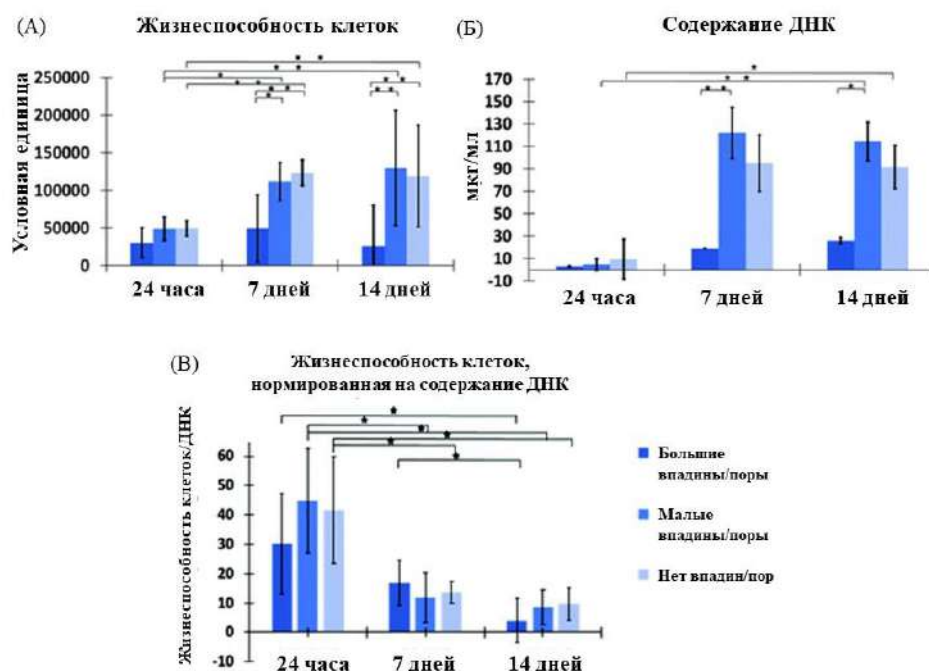


Рисунок 17 – Анализ с использованием Cell Titre Blue. (B) Количество двухцепочечной ДНК в клетках HerG2, измеренное с помощью анализа Picogreen, N = 5, полосы погрешности $\pm$ SD. (C) Жизнеспособность клеток, нормированная по содержанию ДНК [189]

1.5.2.3 Полиамид–6 (РА6)

Полиамид-6 (РА6) представляет собой синтетический полиамид, получаемый преимущественно полимеризацией ϵ -капролактама с раскрытием цикла. Благодаря высокой прочности, износостойкости и возможности получения волокнистых структур РА6 исследуется в ряде биомедицинских приложений [190–193]. РА6 получают путем гидролитической полимеризации ϵ -капролактама; его структура схожа с основной цепью коллагена [191].

Чжан и его исследовательская группа [193] разработали композитные матриксы на основе РА6 для применения в биомедицине. Для повышения биологической активности в состав был добавлен оксид церия (CeO_2). При концентрациях CeO_2 в диапазоне от 0 до 5 % диаметр волокон уменьшался, но увеличивался при концентрации от 7 до 9 %. Было установлено, что оптимальная концентрация CeO_2 составляет 5 %, что обеспечивает минимальную вариабельность диаметра волокон. Испытания на макрофагах и остеобластах мышей показали, что матриксы обладают необходимой биосовместимостью и нетоксичны, при этом пролиферация остеобластов превосходила пролиферацию макрофагов [193].

1.5.2.4 Полигидроксиалканоаты (РНА)

Полигидроксиалканоаты (РНА) представляют собой семейство линейных, термопластичных, алифатических полиэфиров, относящихся к категории биополимеров [194].

Эти полимеры синтезируются микроорганизмами в качестве запасов питательных веществ [195]. Химическая структура РНА зависит от метаболических возможностей микроорганизма [196,197]. РНА можно классифицировать по длине цепи – короткие, средние или длинные, причем каждая из этих групп обладает своими механическими свойствами. Например, короткоцепочечные РНА имеют низкие механические свойства, тогда как среднецепочечные РНА демонстрируют повышенную прочность на разрыв и улучшенные механические характеристики [196].

РНА обладают такими желательными свойствами, как возобновляемость, биосовместимость, механическая прочность и биоразлагаемость в физиологических условиях без образования токсичных побочных продуктов. Для некоторых РНА описаны пьезоэлектрические свойства, что рассматривается как дополнительный фактор, потенциально значимый для регенеративной медицины [198–200].

Матрицы на основе РНА широко используются при лечении ран. Например, Ли и др. [201] использовали РНА в процессе коаксиального электроформования для создания раневых повязок. Внутренний слой состоял из додецилтриметиламмония хлорида и поливинилпирролидона (ПВП), а внешний слой представлял собой смесь РНА и полиэфирсульфона (PES). Для сравнения были также изготовлены одиночные волокна. Авторы отметили, что внешний слой из РНА/PES обладал гидрофобными свойствами, что эффективно предотвращало нежелательное высвобождение биоцидов в физиологических условиях. Одиночные и коаксиальные нановолокна снижали жизнеспособность бактерий *P. aeruginosa* на 97,4 % и 86,9 % соответственно после 2 часов контакта, а через 4 часа жизнеспособность снижалась до 98,9 % и 98,0 %. Эти результаты позволяют предположить, что данные матрицы могут быть эффективны для лечения локализованных раневых поверхностей [201].

1.6 Влияние поверхностно–активных веществ (ПАВ) на электроформование

Введение поверхностно-активных веществ в формуемый раствор позволяет изменять межфазные и электрические характеристики системы и тем самым влиять на устойчивость струи и морфологию образующихся волокон. Адсорбция ПАВ на границе раздела раствор–воздух приводит к снижению поверхностного натяжения, что уменьшает капиллярную тенденцию струи к распаду на капли и может способствовать формированию более однородных бездефектных волокон [202,203]. Для ионных ПАВ дополнительным фактором является повышение электропроводности раствора, способствующее увеличению поверхностной плотности заряда и более интенсивному электростатическому вытягиванию струи [204,205].

Действие ПАВ существенно зависит от его концентрации относительно критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Ниже ККМ молекулы ПАВ находятся преимущественно в мономерной форме и адсорбируются на межфазной границе, монотонно

снижая поверхностное натяжение с ростом концентрации; при достижении ККМ поверхностное натяжение практически стабилизируется, поскольку избыточные молекулы формируют мицеллы в объеме раствора, а не участвуют в дальнейшем насыщении межфазного слоя [206,207]. Следует учитывать, что величина ККМ зависит от природы растворителя, присутствия полимера, температуры и других компонентов формуемой системы; поэтому значения, определенные для водных растворов ПАВ, не могут автоматически переноситься на многокомпонентные растворы для электроформования.

1.6.1 Применение анионных ПАВ в процессе электроформования

К широко используемым анионным ПАВ относится додецилсульфат натрия (SDS). Благодаря диссоциации ионогенной группы его введение может повышать электропроводность раствора и одновременно снижать поверхностное натяжение. В ряде полимерных систем это приводит к уменьшению среднего диаметра волокон и снижению количества бусинчатых дефектов [205,208]. Диоктилсульфосукцинат натрия (AOT), также анионный ПАВ, применялся преимущественно в системах эмульсионного электроформования как стабилизатор дисперсной фазы, обеспечивающий контролируемое распределение размера капель внутренней фазы эмульсии и, соответственно, регулируемую морфологию пор в волокне [209].

1.6.2 Применение катионных ПАВ в процессе электроформования

Цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ), додецилтриметиламмоний бромид (ДТАВ) и родственные соединения (в частности, бензалкония хлорид, ТЕВАС) за счет объемной катионной головной группы показали выраженное повышение проводимости раствора; в системе на основе синтетического водорастворимого полимера НТАВ (гексадецильный аналог) показал наилучшую эффективность в подавлении появления бусин на волокнах по сравнению с анионным и неионными аналогами [204]. Для многих катионных ПАВ характерна сравнительно высокая цитотоксичность которая возникает вследствие электростатического взаимодействия положительно заряженной головной группы с отрицательно заряженными фосфолипидами клеточной мембраны, приводящего к ее дестабилизации и лизису [210,211]. Систематическое исследование токсичности разных типов ПАВ на клеточных и ферментативных тест-системах подтвердило, что катионный СТАВ индуцирует наиболее сильное ингибирование активности люминесцентных бактерий и внутриклеточных ферментных систем по сравнению с неионным Tween-80 и анионным лаурилсульфатом натрия [212].

1.6.3 Применение неионогенных ПАВ в процессе электроформования

Наиболее широко представленная и биомедицински релевантная группа – сложные эфиры сорбитана (Span–20, Span–80), полиоксиэтиленсорбитановые эфиры (Tween–80), алкилфеноксиполиэтоксигликолы (Triton X–100), блок–сополимеры полиоксиэтилена–полиоксипропилена (Pluronic F–108, F–127) и алкилполиглюкозиды. В отличие от ионных ПАВ, неионогенные ПАВ непосредственно не вносят диссоциирующих ионов в раствор; поэтому их влияние на электроформование обычно в большей степени связано с изменением поверхностного натяжения, межфазной организации, вязкости и взаимодействий между компонентами формируемой системы [204,206].

С одной стороны, добавление неионогенного ПАВ во многих системах улучшает морфологию: например, в исследовании электроформования волокон полиэфиримида введение Triton X–100 приводило к уменьшению количества бусин и повышению однородности диаметра [204]. Показано также, что использование неионогенных ПАВ Span–80 в концентрации порядка 10% (относительно полимера) в системах на основе поликапролактона умеренно повышает смачиваемость и адгезию клеток при сохранении первоначального диаметра и морфологии волокна [213].

С другой стороны, в той же работе показано, что дальнейшее увеличение концентрации Span–80 до 30% приводило к статистически значимому уменьшению диаметра волокна, ухудшению механических характеристик и снижению числа адгезированных клеток, особенно в ориентированных матриксах [213].

Алкилполиглюкозиды (APG) представляют собой класс неионогенных ПАВ, молекула которых состоит из гидрофильного глюкозидного (сахаридного) блока, образованного одним или несколькими остатками D–глюкозы, связанными гликозидной связью с гидрофобным алкильным «хвостом», как правило происходящим из природных жирных спиртов растительного (преимущественно кокосового или пальмоядрового) происхождения с длиной цепи C8–C16 [214,215].

Алкилполиглюкозиды (APG) представляют особый интерес для получения биомедицинских волокнистых материалов благодаря сочетанию неионогенной природы, высокой поверхностной активности и способности стабилизировать водно-органические дисперсные системы [214–218]. К данному классу относится кокогликозид, используемый в настоящей работе при формировании многокомпонентных ПЛА-матрикс. Вместе с тем сравнительно низкая токсичность APG по отношению к ряду традиционных ионных ПАВ не исключает концентрационно-зависимого влияния остаточного ПАВ на клеточную адгезию и жизнеспособность. Кроме того, присутствие ПАВ в полимерном матриксе может изменять морфологию волокон, смачиваемость, межфазную организацию, механические свойства и

скорость потери компонентов в водной среде. Поэтому влияние APG на свойства электроформованного материала необходимо рассматривать комплексно, с учетом природы системы растворителей и присутствия других гидрофильных компонентов.

1.7 Виды деградации полимеров

Деградация полилактида (ПЛА) и других алифатических полиэфиров в биологических средах представляет собой совокупность взаимосвязанных процессов. К основным механизмам относят гидролитическое расщепление сложноэфирных связей, окислительную деструкцию под действием активных форм кислорода, ферментативное воздействие и механохимическую деструкцию [219–221]. Относительный вклад каждого механизма зависит от химической структуры полимера, его морфологии и условий окружающей среды. При этом отдельные процессы могут протекать одновременно и взаимно усиливать друг друга.

Важнейшим фактором *in vivo* деградации имплантируемых волокнистых матриц, дополняющим гидролиз, является реакция организма на инородное тело. Адсорбция белков на полимерной поверхности запускает рекрутирование нейтрофилов, а затем макрофагов; при неудачном слиянии макрофагов в инороднотельные гигантские клетки создается локально агрессивная среда с пониженным pH и генерацией АФК и активных форм хлора «окислительный взрыв» (oxidative burst) [222,223]. НАДФН-оксидаза фагоцитов восстанавливает O_2 до супероксид-аниона $O_2^{\bullet-}$, дисмутирующего до H_2O_2 ; миелопероксидаза нейтрофилов конвертирует H_2O_2 и Cl^- в $HOCl$, а в присутствии восстановленных ионов железа (Fe^{2+}) H_2O_2 разлагается по реакции Фентона с образованием гидроксильного радикала $\bullet OH$ –наиболее агрессивного из перечисленных окислителей [223]. Гранулоциты рассматриваются как существенный, но недооцененный фактор, определяющий кинетику резорбции полиэфирных имплантатов [223]. Формирование активных форм кислорода в ходе воспалительного ответа является одним из факторов окислительной деструкции имплантируемых материалов. В модельных исследованиях ускоренного окислительного воздействия для воспроизведения высокой концентрации реакционноспособных радикалов может использоваться система Фентона. При этом такая модель не воспроизводит полностью условия *in vivo*, а позволяет сравнительно оценивать устойчивость материалов к интенсивному окислительному воздействию.

Ферментативная деградация ПЛА реализуется неспецифическими эстеразами, липазами и, в модельных испытаниях, протеиназой К, стереоспецифически узнающей L-звенья [224]. В отличие от поликапролактона и соответствующих алифатических полиэфиров, рассмотренных в [225,226], вклад ферментативной составляющей в деградацию ПЛА сравнительно невелик из-за ограниченной доступности сложноэфирных связей в объеме материала; поэтому для ПЛА обычно доминирует гидролитический механизм. Тогда как для PCL и ряда PHA/PNV вклад ферментативной поверхностной эрозии может быть более выраженным. Механохимическая

деструкция значима для нагружаемых имплантатов (стенты, шовный материал), где циклические деформации ускоряют разрыв ослабленных гидролизом цепей [227].

Следует отметить, что снижение молекулярной массы полимера, изменение морфологии материала и потеря его массы представляют собой различные проявления процесса деградации и могут происходить с различной кинетикой. Поэтому потеря массы матрикса является интегральным показателем его структурной стабильности, но не эквивалентна непосредственно степени разрыва полимерных цепей. Таким образом, использование PBS и раствора Фентона позволяет в модельных условиях сопоставить устойчивость электроформованных ПЛА-матрикса к гидролитическому и ускоренному окислительному воздействию и оценить влияние состава материала на кинетику потери его структурной стабильности.

1.8 Тканевая инженерия с использованием полимерных матрикса, полученных методом электроформования

Электроформованные волокнистые матриксы исследуются в различных направлениях тканевой инженерии благодаря возможности регулирования их пористости, морфологии поверхности, механических свойств и ориентации волокон [228,229]. Эти структурные параметры определяют взаимодействие материала с клетками, включая их адгезию, распространение, миграцию и пространственную организацию. Особый интерес представляют приложения, в которых волокнистая архитектура матрикса может имитировать отдельные особенности внеклеточного матрикса: раневые покрытия, материалы для регенерации нервной ткани и костные тканеинженерные конструкции.

В следующих подразделах рассматриваются ключевые исследования в области тканевой инженерии с акцентом на применение в заживлении ран, инженерии нервной ткани и инженерии костной ткани (рисунок 18). Эти исследования подчеркивают использование многокомпонентных систем на основе биоразлагаемых полимеров для конкретных биомедицинских применений.



Рисунок 18 – Тканевая инженерия с использованием полимерных матриц, полученных методом электроформования: раневые повязки, инженерия нервной ткани и инженерия костной ткани [29]

1.8.1 Полимерные матрицы для регенерации кожи

Электроформованные материалы рассматриваются в качестве основы раневых покрытий благодаря высокой удельной поверхности, пористой структуре и возможности введения биологически активных компонентов.

Ahn и соавт. [230] показали, что введение гидролизата соевого белка в электроформованные матрицы на основе ацетата целлюлозы повышало гидрофильность и шероховатость поверхности и сопровождалось улучшением клеточного ответа фибробластов *in vitro*. Эти результаты демонстрируют возможность регулирования биологических свойств раневых покрытий посредством изменения состава и поверхностной морфологии волокон.

Хронические кожные язвы часто встречаются у людей с диабетом, что подчеркивает необходимость в биоактивных повязках. В этом контексте Чоухан и др. [231] исследовали полимерные матрицы, полученные из различных типов шелкового фиброина (SF) в сочетании с поливиниловым спиртом (PVA). Полимерные матрицы включали составы PVA, PVAAA = (PVA + фиброин шелка *Antheraea assama*), PVABM = (PVA + фиброин шелка *Bombyx mori*) и PVAPR = (PVA + фиброин шелка *Philosamia ricini*). Гибридные матрицы на основе PVA/SF продемонстрировали превосходные характеристики по сравнению с чистым PVA. На основании полученных результатов авторы пришли к выводу, что полученные полимерные матрицы представляют собой надежный материал для раневых повязок, обладающий значительным потенциалом для лечения хронических ран, таких как язвы диабетической стопы.

1.8.2 Полимерные матриксы для регенерации нервной ткани

Инженерия нервной ткани представляет собой одно из активно развивающихся направлений регенеративной медицины, ориентированное на создание условий для восстановления поврежденной нервной ткани. Существенное значение при этом имеют структура и топография матрикса, обеспечивающие адгезию, миграцию, пролиферацию и направленный рост клеток.

Ху и др. [232] исследовали многокомпонентные системы, состоящие из PCL, фактора роста нервов (NGF) и бычьего сывороточного альбумина (BSA), на клетках феохромоцитомы крысы (PC12). Авторы получили выровненные и хаотично ориентированные волокна с помощью метода эмульгированного электроформования в следующих конфигурациях: PCL, PCL/NGF, PCL/BSA и PCL/NGF/BSA. Исследование скорости высвобождения показало, что между хаотично ориентированными и выровненными волокнами практически не было заметной разницы. Профиль высвобождения BSA через 56 дней для случайно ориентированного R-PCL-BSA и выровненного A-PCL-BSA составил $92,57 \% \pm 0,41 \%$ и $94,72 \% \pm 1,94 \%$ соответственно, тогда как стабильное высвобождение NGF из (R/A)-PCL-NGF/BSA наблюдалось в течение 28 дней. Все полимерные матриксы продемонстрировали высокую биосовместимость и не оказали негативного влияния на жизнеспособность клеток. Продолжительное высвобождение NGF способствовало усилению нейрональной дифференцировки клеток. Авторы утверждают, что полученные результаты могут быть направлены на разработку усовершенствованных конструкций для восстановления нервов.

Биокompозитные волокнистые матриксы могут воспроизводить отдельные морфологические особенности внеклеточного матрикса (ECM) и, а также, могут служить в качестве нервных трансплантатов в тканевой инженерии. Киёньска и др. [233] разработали матриксы, состоящие из поли(L-молочной кислоты)-сополимера с поли(ε-капролактоном) (P(LLA-CL)), коллагена I и коллагена III, причем P(LLA-CL) служил в качестве эталона. Клеточные исследования проводились с использованием нервных стволовых клеток линии C17.2. Авторам удалось получить выровненные волокна из P(LLA-CL)/коллагена I/коллагена III, средний диаметр которых составлял 253 ± 102 нм. Примечательно, что пролиферация клеток оказалась на 22 % выше для матриксов, состоящих из P(LLA-CL)/коллагена I/коллагена III, по сравнению с чистым P(LLA-CL). На основании полученных результатов авторы пришли к выводу, что композитные матриксы обладают значительным потенциалом для усиления регенерации нервов.

Таким образом, эффективность волокнистых матриксов для нервной ткани определяется не только химическим составом материала, но и пространственной организацией волокон. Управление направленностью волокнистой структуры позволяет регулировать клеточную

ориентацию и представляет особый интерес для материалов, предназначенных для анизотропно организованных тканей.

1.8.3 Полимерные матриксы для регенерации костной ткани

Электроформованные матриксы исследуются также в инженерии костной ткани, где важны высокая пористость, развитая поверхность, механическая стабильность и возможность введения остеокондуктивных компонентов [234]. Например, показано, что включение деминерализованного костного матрикса и нанодисперсных наполнителей в электроформованные полимерные системы может одновременно изменять их механические свойства и клеточный ответ остеобластоподобных клеток [235]. Эти данные иллюстрируют общий принцип многофакторного управления свойствами тканеинженерных матриксов посредством изменения их состава и структуры.

1.9 Выводы по литературному обзору

Анализ литературных данных показывает, что структура и свойства электроформованных полимерных матриксов определяются совокупным влиянием природы полимера, системы растворителей, реологических и электрических характеристик формируемого раствора, функциональных добавок и условий формирования волокон. Для полилактида выбор системы растворителей оказывает существенное влияние на диаметр и поверхностную морфологию волокон, тогда как введение гидрофильных компонентов и поверхностно-активных веществ может дополнительно изменять межфазную организацию, механические свойства и устойчивость материала к деградации.

Особый интерес представляет установление того, как совместное введение гиалуроната натрия и неионогенного ПАВ в многокомпонентную систему на основе ПЛА изменяет процесс формирования волокон, их морфологию, механические свойства и деградационное поведение. Вместе с тем влияние таких компонентов не может рассматриваться независимо от природы системы растворителей, поскольку изменение состава раствора одновременно затрагивает процесс формирования волокна, его морфологию и последующие свойства материала. Недостаточно изучена также взаимосвязь между остаточным растворителем, состоянием электроформованного ПЛА и его способностью к последующей ориентационной деформации.

Таким образом, представляет интерес комплексное исследование взаимосвязи “состав формируемой системы – структура волокна – механические свойства – устойчивость к деградации – биологический ответ” для электроформованных ПЛА-матриксов, а также разработка способов управления ориентацией волокон. Решению этих задач посвящена экспериментальная часть настоящей работы.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Материалы

Поли(D,L–лактид) (ПЛА, Ingeo™ 4032D, $M_w \approx 110$ кДа) NatureWorks LLC (Блэр, Небраска, США)

1,1,1,3,3,3–гексафтор–2–пропанол (ГФИП, ≥ 99 %) Sigma–Aldrich (Сент–Луис, штат Миссури, США)

Тетрагидрофуран (ТГФ, аналитический) EKOS–1 (Москва, Россия)

Дихлорметан (ДХМ, аналитический) EKOS–1 (Москва, Россия)

Диметилформамид (ДМФ, аналитический) EKOS–1 (Москва, Россия)

Этанол (95 %; ОАО «Кемеровский фармацевтический завод», Кемерово, Россия)

Фосфатно–солевой буферный раствор (Phosphate buffered saline, PBS) – Биолот, Россия

Пероксид водорода (H_2O_2 , 30%) – РусХим ООО, Санкт–Петербург, Россия

Сульфат железа(II) ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) – АО «Вектон», Санкт–Петербург, Россия

Гиалуронат натрия ($M_w \approx 1,3$ MDa) (ГН) – Shandong LiYoung Biotechnology Co., Ltd., Китай

Коко–глюкозид (ПАВ) – Fenchem Biotek Ltd., Китай

2.2 Получение волокнистых матриц методом электроформования

Волокнистые матрицы на основе ПЛА были изготовлены с помощью системы электроформования (NF–500 MECC Co., Ltd., Япония). Растворы ПЛА для электроформования в концентрации 100 мг/мл были приготовлены путем растворения полимеров в ГФИП, ДХМ, а также в смесях: ДХМ–ТГФ (ДТ) в соотношении 8:2 об./об., ГФИП/ДХМ 3:7 об./об., ГФИП/ДХМ 2:8 об./об., ГФИП/ДХМ 1:9 об./об. последующим перемешиванием до полного растворения при комнатной температуре.

Перед электроформованием раствор дегазировали в течение 12 часов. Полимерный раствор загружали в шприц объемом 12 мл, для подачи раствора использовали тупоконечную иглу из нержавеющей стали калибра 22G (калибра), скорость подачи раствора 1 мл/ч, расстояние от иглы до коллектора 275 мм, время формования матрикса 5 часов. Электроформованные волокна собирали на пластину–коллектор (рисунок 19), покрытую алюминиевой фольгой для облегчения сбора волокон. Процесс электроформования проводился при комнатной температуре (25 °C), относительная влажность 45–60%, при этом между иглой и коллектором подавалось напряжение 35 кВ для формирования стабильной полимерной струи. Параметры электроформования были предварительно оптимизированы для получения стабильной полимерной струи и воспроизводимой морфологии волокон.

Для получения многокомпонентных матриц в формуемый раствор вводили кокогликозид в количестве 5 мас.% от общей массы раствора. Концентрация гиалуроната натрия

в дистиллированной воде составляла 1 мас.%, раствор гиалуроната натрия вводили в количестве 10 или 20 об.% относительно общего объема полимерного раствора, используемого для электроформования. Для получения эмульсионной системы водную фазу, содержащую гиалуронат натрия, диспергировали в органической фазе PLA при условиях перемешивания в течении 1-го часа. После приготовления систему использовали для электроформования при тех же параметрах, что и для систем без гиалуроната натрия.

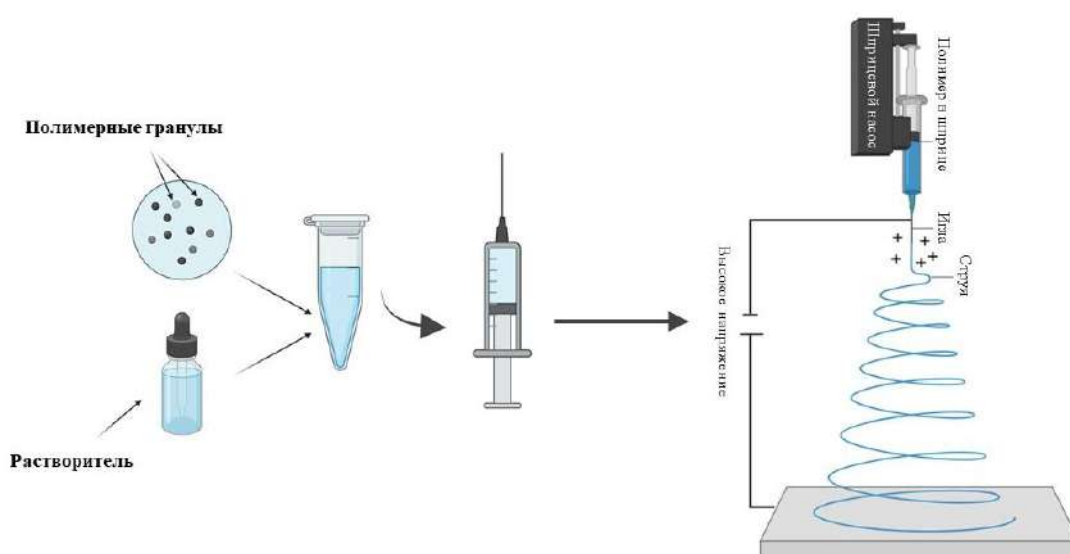


Рисунок 19 – Установка для электроформования

2.3 Получение направленных волокнистых матриц альтернативными методами

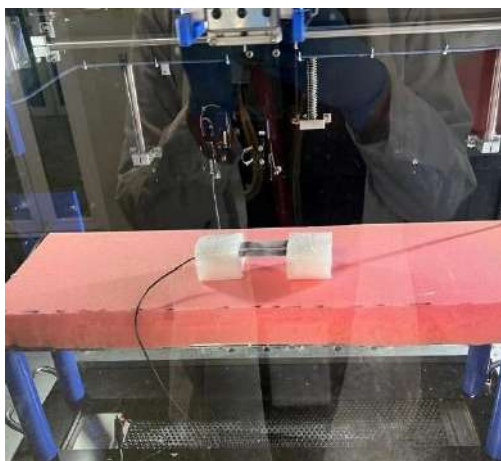
Способы получения ориентированных полимерных матриц являются актуальными для многих научных исследований. Ориентированные волокна задают направление роста клеточных культур. В рамках нашего исследования мы использовали альтернативные способы получения направленных волокон, отличные от классических методов.

В первом способе (рисунок 20 а и б) в качестве коллектора для сбора волокон выступали заземленные параллельные электроды, вызывающие изменение электрического поля, при котором линии поля становились направленными к электродам. Это изменение поля приводило к развороту волокон перпендикулярно краю электродов, что обеспечивало высокую степень их ориентирования.

На рисунке 20 под буквами в) и г) представлена установка с магнитами. Во втором способе полимерные волокна собирались на коллекторе, состоящем из магнитов, расположенных к друг

другу противоположным полюсам. При этом градиент магнитного поля рассматривался как один из факторов, способных влиять на преимущественную ориентацию формирующихся волокон.

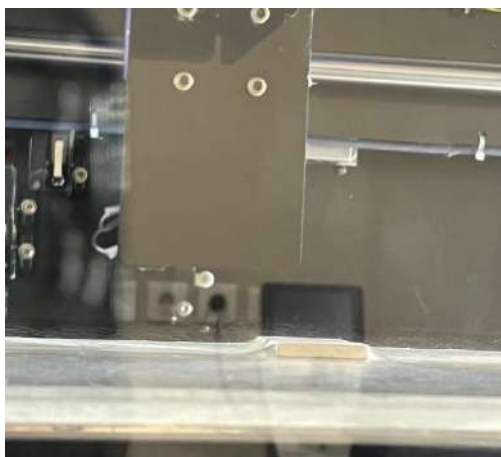
а)



б)



в)



г)



Рисунок 20 – Установки для сбора направленных волокон а), б) – параллельные электроды, в), г) – магниты

Материалы, ориентированные за счет постформовочного вытягивания в этаноле, получали следующим образом. Свежеизготовленные полимерные волокнистые матрицы, полученные (ПЛА-ГФИП, ПЛА-ДТ (ДХМ-ТГФ)) методом электроформования и высушенные (5 дней при 37 °С в вакууме) растягивали вручную в 95 %-ном этаноле с помощью шагового механизма путем постепенного вращения регулировочного винта. Матрицы с исходными размерами 2 × 2 см

растягивали до инженерной деформации в 100 %, 200 % и 300 % от их первоначального размера. Растянутые матриксы затем сушили в течение 4 часов при 37 °С в вакууме.

Использование жидкой среды во время растяжения обусловлено пластифицирующим действием этанола на аморфную фазу ПЛА: молекулы спирта диффундируют в полимерный матрикс, увеличивают свободный объем и снижают температуру стеклования, тем самым повышая сегментальную подвижность аморфной фазы и облегчая деформацию материала [236]. Коэффициент диффузии этанола в волокнах ПЛА составляет $D \approx 5 \times 10^{-11} \text{ см}^2/\text{с}$, это показывает, что для радиуса волокна ~250-900 нм насыщение этанолом может происходить за несколько десятков секунд [100].

2.4 Оценка морфологии волокон методом сканирующей электронной микроскопии

Морфологию волокон исходных материалов состава ПЛА–ГФИП, ПЛА–ДХМ, ПЛА–ДТ в соотношении 8:2 об/об, ГФИП/ДХМ 3:7 об/об, ГФИП/ДХМ 2:8 об/об, ГФИП/ДХМ 1:9 об/об, ДХМ/ДМФ 7:3 об/об исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ; Carl Zeiss Crossbeam 550, Оберкохен, Германия) с использованием детектора SE2. Изображения получали при ускоряющем напряжении 10 кВ и токе пучка 300 пА. Для улучшения проводимости образцы были покрыты методом распыления слоем Au/Pd (80:20) толщиной 10 нм (Quorum Q150T S/E/ES Plus). Для каждого образца измеряли диаметры 100 случайно выбранных волокон на каждый образец с использованием программного обеспечения ImageJ (НИН, Бетесда, Мэриленд, США). Ориентация волокон определялась с помощью инструмента OrientationJ в программе ImageJ (НИН, Бетесда, Мэриленд, США).

Распределение ориентации волокон и их когерентность в нетканых матриксах ПЛА оценивались с помощью цифрового анализа изображений с использованием программного обеспечения ImageJ (НИН, Бетесда, Мэриленд, США) с плагином OrientationJ (версия 2.0.5, EPFL, Швейцария). Для каждого образца анализировались растровые изображения, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). В настройках плагина применялся метод локального тензора структуры с гауссовым ядром градиента. Плагин вычислял функцию OJ–Distribution – взвешенную гистограмму ориентации, в которой по горизонтальной оси отображается угол отклонения волокон от горизонтали изображения (в диапазоне от –90° до +90°), а по вертикальной оси – кумулятивный вклад каждого угла, пропорциональный степени локальной анизотропии.

Матриксы, заселенные клетками, подготавливали для СЭМ путем последовательной фиксации, промывки PBS, дегидратации и химической сушки. Клетки сначала фиксировали в 4 %-ном параформальдегиде (PFA) в течение 30 мин при комнатной температуре, промывали 3 раза PBS (по 5 мин каждый раз), а затем дегидратировали с помощью серии растворов этанола

различной концентрации (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % $\times$ 2; по 10 мин на каждый этап). В заключение образцы обрабатывали гексаметилдисилазаном (HMDS, 99 %) в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем на них наносили покрытие методом распыления, как описано для исходных матриксов.

Элементный анализ проводился с использованием детектора энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) (Quantax XFlash, Bruker, Оберкохен, Германия). Распределение элементов отображалось с помощью режима сбора данных Smart Map, позволяющего одновременно собирать рентгеновские данные по каждому пикселю в пределах выбранной области. Спектры регистрировались при ускоряющем напряжении 10 кВ.

2.5 Характеризация внутренней структуры методом сканирующей просвечивающей электронной микроскопии

Для характеристики пористости волокон проводили СПЭМ–анализ тонких срезов исследуемых образцов с помощью сканирующего электронного микроскопа Carl Zeiss Crossbeam 550 при ускоряющем напряжении 30 кВ и токе 250 пА. Для подготовки образцов полимерные матриксы заливали в смолу Araldite и сушили в вакууме в течение 2 ч, а затем еще 36 ч при температуре 60 °С. Ультратонкие срезы (220–270 нм) были подготовлены с помощью ультрамикротомы Leica EM UC7 (Leica, Вецлар, Германия) и закреплены на медных сетках с размером ячейки 300 меш для исследования методом СПЭМ (рисунок Б.1).

2.6 Квазистатические испытания на растяжение

Механические свойства оценивались методом квазистатического одноосного растяжения с использованием динамического механического анализатора RSA–G2 (TA Instruments, Нью–Касл, штат Делавэр, США) при температуре 25 °С. Испытания проводили при постоянной скорости перемещения траверсы 0,1 мм/с до разрушения образца без предварительного циклирования в соответствии с ISO 9073–3, количество измерений для одного вида материала $n=5$. Образцы в форме «собачьей кости» с шириной измерительного участка 2 мм и длиной измерительного участка 12 мм вырезались с использованием вырубной формы геометрии типа VII в соответствии с ГОСТ 270–75 и ручного гидравлического пресса, при этом материал во время вырезания размещался на плоской жесткой подложке. Такая геометрия образца была выбрана для обеспечения локализации деформации и разрушения в пределах измерительного участка, а также для минимизации концентрации напряжений в зажимах. Толщину матрикса измеряли в трех точках после его размещения между предметными стеклами для оптической микроскопии. Для расчета инженерного напряжения площадь поперечного сечения образца определяли как произведение средней толщины матрикса на ширину рабочего участка. Оцениваемые параметры

включали модуль упругости при растяжении, условный предел упругости определяли как значение напряжения, соответствующее окончанию линейного участка диаграммы «напряжение–деформация», предел прочности при растяжении, определяемый как максимальное напряжение до разрушения; и относительное удлинение при разрыве, соответствующее деформации при разрушении [237].

2.7 Исследование теплофизических свойств полимерных электроформованных матриц

Теплофизические свойства образцов определялись методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Измерения проводились на приборе Mettler Toledo DSC 3+ с использованием алюминиевых тиглей в инертной атмосфере азота при расходе продувочного газа 80 мл/мин. Масса образца составляла от 1 до 3 мг. Термическая программа состояла из одного нагрева от 25 °С до 200 °С с последующим охлаждением до комнатной температуры. Температура стеклования (T_g) определялась по первому нагреву по скачкообразному изменению теплоемкости (ΔC_p), зарегистрированному во время сканирования нагрева, и устанавливалась как точка перегиба кривой теплового потока в соответствии со стандартом ASTM E1356–08 [238].

2.8 Рентгеновское рассеяние в малых и больших углах (МУРР/БУРР)

Двумерные картины малоуглового и широкоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР и БУРР) электроформованных матриц из ПЛА были зарегистрированы в пропускающей геометрии с использованием лабораторного рассеятельного прибора Xeuss 3.0 (Xenocs, Гренобль, Франция), оснащенного микрофокусным источником GeniX 3D Cu (излучение Cu K α , $\lambda = 1,54189$ Å) и гибридным детектором EIGER2 Si 1M (DECTRIS, Швейцария; размер пикселя 75×75 мкм²). Измерения проводились при комнатной температуре (292 К) в вакуумной камере для образцов, давление в которой поддерживалось на уровне примерно 1 мбар. Расстояние от образца до детектора составляло 1,00 м для МУРР и 50 мм для БУРР, что обеспечивало диапазоны q 0,008–0,350 Å⁻¹ и 0,15–4,10 Å⁻¹, соответственно. Для каждого образца было получено по два кадра с временем экспозиции 3600 с на кадр для МУРР и 1800 с на кадр для БУРР.

Матрицы устанавливались вертикально, при этом направление растяжения или преобладающее направление волокон, в зависимости от ситуации, выравнивалось параллельно вертикальной оси детектора. Падающий рентгеновский пучок направлялся перпендикулярно поверхности матрикса и проходил через всю его толщину. Величина вектора рассеяния, q , калибровалась независимо для двух геометрий измерения с использованием первых нескольких порядков дифракции бегената серебра для МУРР и многократных отражений гексаборида лантана (LaB₆) для БУРР.

Два кадра, полученные для каждого измерения, были объединены с использованием проекции по пикселям с минимальной интенсивностью для подавления спорадического шума. Коррекция пропускания образца или вычитание паразитного или фонового рассеяния не применялись. В частности, вклад изотропного рассеяния матов из ПЛА был сохранен в данных, использованных для последующего анализа. Двумерные картины рассеяния были интегрированы по азимуту в одномерные профили $I(q)$ с помощью XSACT 2.0 (Xenocs, 2020). Азимутальные профили интенсивности, $I(\varphi)$, были извлечены и проанализированы с помощью Igor Pro 6.37 (WaveMetrics, 2014).

Ориентация на молекулярном уровне, определенная по картинам БУРР, была количественно оценена с использованием классического трехмерного ориентационного коэффициента Херманса (формула 1) [239–241]:

$$f_{3D} = \frac{3(\cos^2 \varphi)_{3D} - 1}{2} \quad (1)$$

где среднеквадратичное значение косинуса, взвешенное по интенсивности, рассчитывалось как (формула 2)

$$(\cos^2 \varphi)_{3D} = \frac{\int_0^\pi I_{WAXS}(\varphi) \cos^2 \varphi \sin \varphi d\varphi}{\int_0^\pi I_{WAXS}(\varphi) \sin \varphi d\varphi} \quad (2)$$

Здесь φ – угол ориентации относительно выбранной опорной оси, а $I_{БУРР}(\varphi)$ – соответствующая азимутальная интенсивность. Член $\sin \varphi d\varphi$ учитывает элемент телесного угла, связанный с трехмерным распределением ориентации [242,243]. Данный подход предполагает приблизительно одноосное распределение ориентации.

Проецированная в плоскости анизотропия, определенная по дифрактограммам МУРР, была количественно оценена с помощью двумерного параметра ориентации (формула 3) [244]:

$$f_{2D} = 2(\cos^2 \varphi)_{2D} - 1 \quad (3)$$

где

$$(\cos^2 \varphi)_{2D} = \frac{\int_0^\pi I_{SAXS}(\varphi) \cos^2 \varphi d\varphi}{\int_0^\pi I_{SAXS}(\varphi) d\varphi}$$

В двумерном случае взвешивание $\sin \varphi d\varphi$ не применялось, поскольку азимутальная интенсивность МУРР рассматривалась как проецированное распределение ориентации в плоскости [242,243]. Сохранение изотропной компоненты позволяет учитывать ее вклад в эффективную степень анизотропии, а не анализировать исключительно ориентированную часть рассеяния.

2.9 Оценка потери массы матриц в PBS и растворе Фентона

Деградацию матриц оценивали путем мониторинга изменения массы в течение 40-дневного периода инкубации в PBS (pH 7,4) и в реагенте Фентона pH 3–4, который является моделью ускоренной окислительной деградации. Реагент Фентона состоял из 100 мМ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 1 мМ H_2O_2 (30 %-ный раствор H_2O_2), приготовленного в дистиллированной воде. Свежий раствор (pH 3–4) готовили непосредственно перед использованием. Инкубацию проводили при 37 °C; PBS использовали как модель нейтральной водной среды, тогда как раствор Фентона применяли как модель ускоренного окислительного воздействия. Растворы обновлялись каждые 3 дня. Начальный сухой вес каждого образца (W_i) измеряли перед погружением. Изменения массы пористого каркаса отслеживали через 5, 10, 20 и 40 дней [245]. В каждую временную точку матрицы трижды промывали деионизированной водой, сушили при 37 °C в течение 24 ч и повторно взвешивали (W_d). Потеря массы рассчитывалась по формуле 4:

$$\text{Потеря массы (\%)} = \frac{(W_i - W_d)}{W_i \times 100} \quad (4)$$

W_i – начальный сухой вес образца;

W_d – повторное взвешивание образца после временной точки.

2.10 Оценка роста клеточных культур на матрицах

Кожные фибробласты (HDF) и мезенхимальные стволовые клетки пуповины (UC-MSC) были получены из банка клеточных культур ИБМХ им. В.Н. Ореховича. Клетки культивировали в стандартных условиях в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 , 37°C) в полной ростовой среде на основе DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% FBS (Gibco, США) и 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco, США). При достижении 70-80 %-ной конfluence осуществляли пассирование клеток. Для этого ростовую среду удаляли, дважды промывали клетки раствором Версена (ПанЭко, Россия), добавляли 0,25 %-ный раствор трипсина (ПанЭко, Россия), инкубировали в течение 5 мин при 37°C до полного открепления клеток от подложки. Рассаживали клетки в соотношении 1:3. Морфологию клеток оценивали с использованием фазово-контрастного светового микроскопа Zeiss Axiovert 40CFL («Zeiss», Германия) и фотокамеры Nikon D5000 («Nikon», Япония). Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева. Жизнеспособность определяли по исключению трипанового синего. Клетки дермальных фибробластов человека (HDF) и мезенхимальные стромальные клетки пуповины (UC-MSC) высевали на электроформованные полимерные матрицы ПЛА-ДТ с различной организацией волокон: направленной, хаотичной и с добавлением ПАВ. Посев осуществляли в 24-луночные культуральные планшеты из расчета 50 000 клеток на лунку. Перед посевом клетки предварительно окрашивали флуоресцентным липофильным красителем RKN-26 (Lumiprobe) в соответствии с протоколом производителя. RKN-26 – амфифильный краситель, который

нековалентно и стабильно встраивается в липидный бислой плазматической мембраны клетки за счет длинных алифатических углеводородных хвостов.

Визуализацию клеток на матриксах на 7-е сутки культивирования проводили методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Каждое изображение получено в одном канале детекции (сигнал красителя RKN-26), поле обзора каждого снимка составляло 1272.79×1272.79 мкм при разрешении 1024×1024 пикселя.

Размер одного пикселя изображения в микрометрах d_{px} рассчитывали по формуле 5:

$$d_{px} = \frac{L_{FOV}}{N_{px}} \quad (5)$$

где L_{FOV} – линейный размер поля обзора в микрометрах (1272,79 мкм);

N_{px} – линейное разрешение изображения в пикселях (1024 px).

Теоретическую плотность посева клеток $D_{посев}$ рассчитывали по формуле 6:

$$D_{посев} = \frac{N_{исх}}{S_{лунки}} \quad (6)$$

где $N_{исх}$ – число посеянных клеток на лунку (50 000);

$S_{лунки}$ – площадь дна лунки культурального планшета (190 мм²).

Плотность клеток на матриксе на 7-е сутки D_7 рассчитывали по формуле 7:

$$D_7 = \frac{N_{клеток}}{S_{FOV}} \quad (7)$$

Индекс относительного роста (Retention-Growth Index, RGI), отражающий суммарный эффект адгезии и пролиферации клеток относительно исходной плотности посева, рассчитывали по формуле 8:

$$RGI = \frac{D_7}{D_{посев}} \quad (8)$$

$RGI=1$ соответствует полному сохранению исходной плотности посева;

$RGI>1$ указывает на прирост числа клеток за счет пролиферации;

$RGI<1$ отражает отношение клеточной плотности на 7-е сутки к расчетной исходной плотности посева и характеризует интегральный результат первоначальной адгезии, сохранения клеток и последующего роста.

Значение RGI не позволяет независимо разделить вклад адгезии, гибели и пролиферации.

2.11 Оценка жизнеспособности клеток

Для оценки клеточного заселения HDF и UC-MSC использовали окрашивание RKN-26, как описано в разделе 2.10.

Жизнеспособность отдельно оценивали для первичной нейрональной культуры коры головного мозга мышей C57Bl/6 получали и культивировали согласно методике, описанной в [247]. Анализ жизнеспособности проводили только для первичных кортикальных нейронов, культивируемых на ПЛА-матриксах, с использованием двойного флуоресцентного окрашивания

Hoechst 33342 и пропидиййодидом (PI). Клетки инкубировали с 2 мкг/мл Hoechst 33342 и 2 мкг/мл PI в течение 30 мин, после чего фиксировали в 4 %-ном растворе ПФА. Изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (ZEISS LSM 980 Airyscan, Оберкохен, Германия) при 10-кратном увеличении. Параметры возбуждения/излучения: Hoechst 33342 (возбуждение 405 нм, излучение 445–485 нм, мощность лазера 0,5–1 %); PI (возбуждение 561 нм, излучение 600–650 нм, мощность лазера 1–2 %). Hoechst 33342 использовался для визуализации всех клеточных ядер, тогда как PI-положительные ядра интерпретировались как клетки, демонстрирующие нарушенную целостность плазматической мембраны на момент окрашивания. Учитывая, что фиксация проводилась после окрашивания, данный анализ представляет собой конечную оценку относительной жизнеспособности клеток, а не строгое разграничение между живыми и мертвыми клетками или определение цитотоксичности. Жизнеспособность клеток количественно оценивали путем подсчета живых (Hoechst⁺/PI⁻) и мертвых (PI⁺) клеток на 1-й, 5-й, 7-й и 10-й дни с использованием программного обеспечения ImageJ/Fiji версии 1.54 (NIH, Бетесда, Мэриленд, США).

2.12 Оценка биосовместимости полилактидных матриксов в модели хорионаллантоисной мембраны куриного эмбриона (ХАМ)

Для создания ХАМ-модели оплодотворенные яйца кур породы White Leghorn (All eggs) дезинфицировали 3 % раствором пероксида водорода и ультрафиолетовым излучением (10 мин), после чего инкубировали при 37,8 °С и относительной влажности 50–70 % с активной аэрацией и ротацией каждые 6 ч. На 8-й день эмбрионального развития (ЭР) проводили овоскопию и исключали нежизнеспособные эмбрионы. ХАМ экспонировали методом искусственной воздушной камеры. На латеральной поверхности яйца формировали операционное окно (1–1,5 см²), сохраняя целостность подскорлупной мембраны. Со стороны воздушной камеры создавали дополнительное отверстие (0,6 мм) и осуществляли аспирацию воздуха для отделения ХАМ от подскорлупной мембраны. После удаления последней на поверхность ХАМ наносили 20 мкл раствора антибиотика/антимикотика (1х; Gibco) и имплантировали стерильные силиконовые кольца (внутренний диаметр 1 см). Окно герметизировали пленкой Parafilm и инкубировали яйца без ротации в течение 24 ч (рисунок 21)

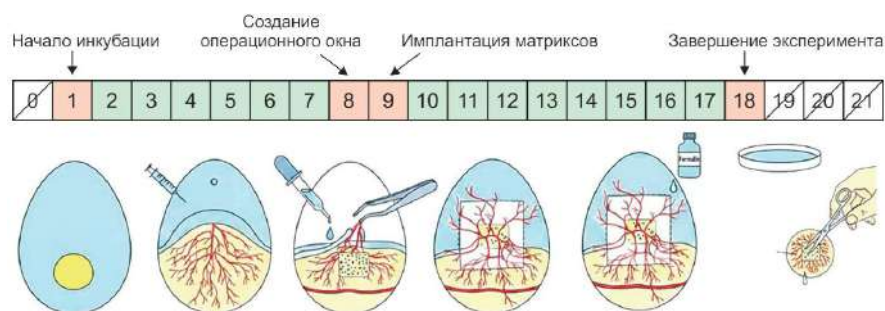


Рисунок 21 – Схема проведения эксперимента в модели ХАМ

Перед трансплантацией на ХАМ матриксы стерилизовали ультрафиолетовым излучением (1 ч) и на 9-й день ЭР размещали на поверхности ХАМ. После повторной герметизации инкубацию продолжали до 18-го дня ЭР без ротации. На 18-й день ЭР на ХАМ наносили 2–5 мл 10 % нейтрального забуференного формалина для эвтаназии эмбриона и предфиксации тканей. Через 2 ч участки ХАМ диаметром 1–2 см, содержащие трансплантат, иссекали, фотодокументировали и фиксировали в формалине не менее 24 ч для последующей гистологической обработки.

2.13 Подготовка парафиновых блоков для гистологии, окрашивание срезов

Фиксированные образцы ХАМ позиционировали в гистологических кассетах таким образом, чтобы плоскость среза проходила парасагиттально по отношению к фронтальной плоскости ХАМ, после чего осуществляли стандартную гистологическую проводку и заливку в парафин с использованием автоматического гистопроцессора ASP6025 (Leica Biosystems). Серийные парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили на ротационном микротоме HM355 (Thermo Scientific), после чего проводили стандартные процедуры окрашивания гематоксилином и эозином (H&E). Предобработку парафиновых срезов и все этапы окрашивания выполняли в автоматическом режиме с использованием системы BOND-III IHC/ISH (Leica Biosystems). Окрашенные срезы заключали под покровные стекла с использованием системы CV5030 (Leica Biosystems), после чего выполняли полнослайдовое сканирование срезов с использованием цифрового сканера Aperio AT2 (Leica Biosystems) при 200-кратном увеличении (виртуальный объектив 20×). Дальнейший анализ и фотодокументирование полученных изображений выполняли с использованием цифровой патоморфологии на платформе Zoom. Гистологическую оценку проводили описательно на основании наличия и выраженности клеточной инфильтрации, сосудистых структур, грануляционной ткани и воспалительной реакции.

2.14 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы Microsoft Excel, GraphPad Prism 10 и OriginPro. Количественные данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SD, в зависимости от типа эксперимента; используемый показатель вариабельности указан в соответствующих таблицах и подписях к рисункам. Для оценки статистической значимости различий при анализе потери массы полимерных матриц использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA), где в качестве

независимых факторов рассматривали состав матрикса и продолжительность инкубации в деградационной среде.

Для множественных попарных сравнений групп в пределах каждой временной точки применяли post hoc тест Тьюки (Tukey's multiple comparisons test). Для оценки механических характеристик и скорости потери массы, количество независимых измерений составляло $n=5$. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. В графиках статистическую значимость обозначали следующим образом: Обозначения значимости: **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns – различия статистически незначимы ($p \geq 0,05$).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Морфология волокон из ПЛА на основе разных растворителей и их смесей

Морфология электроформованных ПЛА-волокон существенно зависит от природы и состава системы растворителей. Различия в летучести растворителей, их взаимодействии с полимером, а также в реологических и электрических свойствах формируемого раствора могут влиять на кинетику затвердевания струи и формирование поверхностной пористости [17,38,48]. В настоящей работе были сопоставлены индивидуальные растворители ГФИП и ДХМ, а также бинарные системы: ДХМ-ТГФ 8:2 об./об., (далее ДТ), ДХМ-ДМФ и ДХМ-ГФИП в различных объемных соотношениях.

Выбор указанных растворителей обусловлен их способностью растворять ПЛА, а также в их различающихся значениях температуры кипения и давления насыщенных паров, что позволяет варьировать условия испарения растворителей и фазового разделения в ходе электроформования.

По результатам анализа методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) установлено, что наиболее выраженной пористой структурой поверхности обладают волокна, полученные из смеси ДТ, смеси ГФИП-ДХМ в соотношении 1:9 об./об. и чистого ДХМ (рисунок 22 Б, рисунок 23 А). Как было отмечено в главе 1, размер и морфология пор поддаются контролю посредством варьирования параметров процесса и природы растворителя. На представленных СЭМ-изображениях (рисунок 22 Б, рисунок 23 А, рисунок 24 А–В) можно наблюдать поверхностные поры, выполняющие функцию модификатора топографии внешнего слоя волокна за счет увеличения площади его поверхности.

На рисунке 22 сопоставлены материалы, полученные из индивидуальных растворителей – ГФИП (А) и ДХМ (Б); для них характерна выраженная разница в морфологии поверхности волокон: материал на основе ГФИП характеризуется гладкой поверхностью, тогда как материал на основе ДХМ – пористой. Средний диаметр волокон также различается между образцами: для ПЛА-ГФИП он составил 1300 ± 250 нм, для ПЛА-ДХМ – 1500 ± 300 нм.

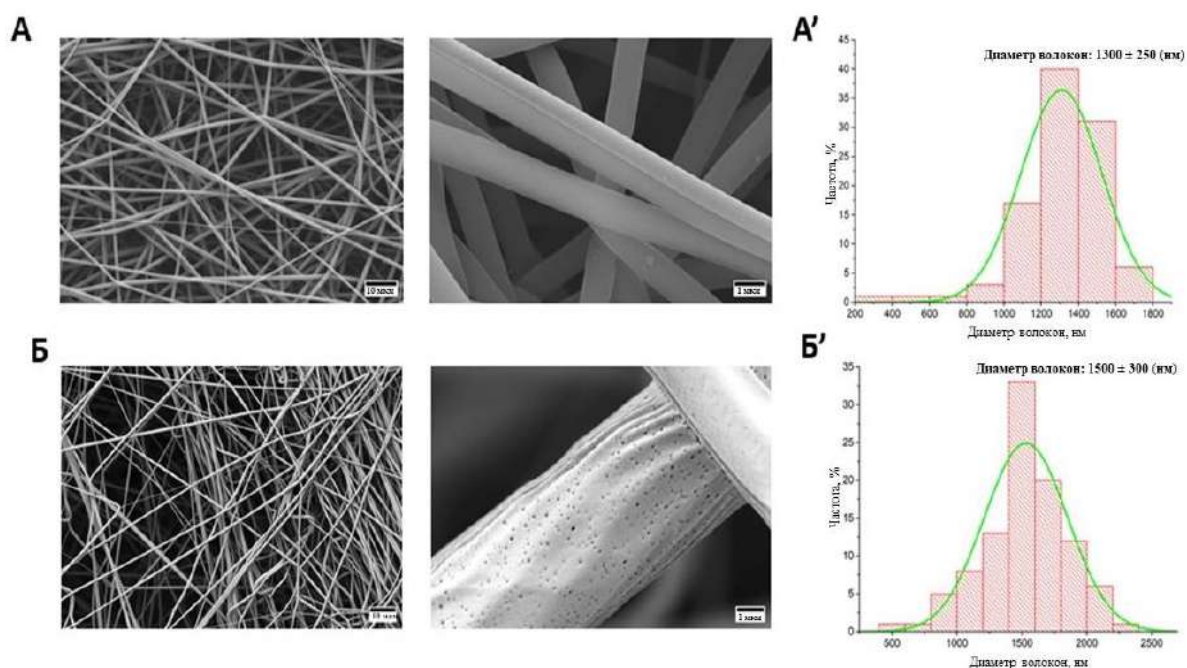


Рисунок 22 – СЭМ–микрофотографии: (А) ПЛА–ГФИП, (Б) ПЛА–ДХМ Средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ SD), показанные на рисунках (А', Б')

Следующая исследованная группа систем растворителей включала смеси ДХМ-ТГФ в соотношении 8:2 об./об. и ДХМ-ДМФ в соотношении 7:3 об./об. (рисунок 23 А, Б); выбор данных соотношений обусловлен различием температур кипения, влияющим на кинетику испарения растворителя, фазового разделения и затвердевания струи. Несмотря на низкую температуру кипения ДХМ, для образца ПЛА-ДХМ-ДМФ поверхностные поры не были зафиксированы, что объясняется существенно более высокой температурой кипения ДМФ (разница температур кипения компонентов составляет 113,4 °C). Вследствие низкой летучести ДМФ не успевал испариться за время полета струи от иглы до коллектора, что поддерживало текучесть полимерного раствора на поверхности формирующегося волокна и способствовало «схлопыванию» (сглаживанию) потенциальных пор.

Принципиально иная картина наблюдалась для материала ПЛА-ДТ: разница температур кипения ДХМ и ТГФ составила 26,4 °C, что существенно ниже, чем в системе ДХМ-ДМФ. Система ДТ 8:2 об./об. была выбрана для дальнейшей работы, поскольку обеспечивала формирование выраженной поверхностной пористости волокон и не демонстрировала признаков остаточного хлорсодержащего растворителя в пределах чувствительности ЭДС-анализа. Сочетание низкой температуры кипения и высокого давления насыщенных паров ДХМ с относительно высокой относительной влажностью окружающей среды (около 60%) обусловило формирование несквозных пор на поверхности волокон. Добавление ТГФ, в свою очередь,

позволяет управлять суммарной скоростью испарения систему растворителей и, соответственно, кинетикой отверждения волокон.

Средний диаметр волокон для данной группы образцов также демонстрирует существенные различия: для ПЛА-ДТ он составил 2300 ± 615 нм, тогда как для ПЛА-ДХМ- ДМФ – 900 ± 150 нм. Срезы волокон ПЛА-ДТ представлены в приложении 5.

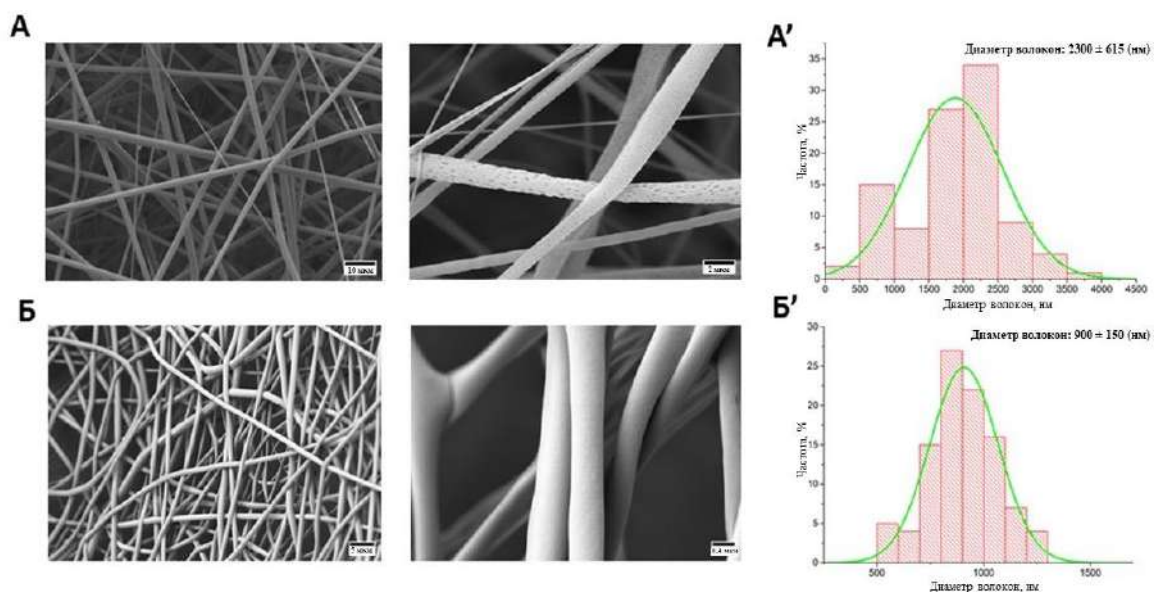


Рисунок 23 – СЭМ–микрофотографии: (А) ПЛА–ДТ, (Б) ПЛА–ДХМ-ДМФ-7:3 Средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ SD), показанные на рисунках (А', Б')

Отдельного рассмотрения заслуживает влияние агрегатного состояния полимера в процессе испарения растворителя. Температура стеклования (T_g) ПЛА находится в диапазоне 55–60 °C [246]. В материалах на основе ПЛА, находящихся в застеклованном состоянии, ограниченная сегментальная подвижность полимерной матрицы может затруднять диффузионный выход остаточных растворителей, как ДХМ, так и ТГФ, способствуя стабилизации пористой структуры.

Система растворителей ГФИП-ДХМ была исследована в трех соотношениях: 1:9 об./об. (А), 2:8 об./об. (Б) и 3:7 об./об. (В) (рисунок 24). Для всех трех образцов зафиксирована выраженная поверхностная пористость волокон. Образец ГФИП-ДХМ-1:9 характеризуется наиболее развитой поверхностью волокон в исследованной серии: поры покрывают всю поверхность волокна и представляют собой не округлые углубления (как в образцах, показанных

на рисунок 22 Б и рисунок 23 А), а глубокие овальные впадины с заостренными вытянутыми краями. В образце ГФИП-ДХМ-3:7, характеризующемся наибольшим содержанием ГФИП, поры также равномерно распределены по поверхности волокон, однако имеют форму небольших округлых углублений, что принципиально отличает их морфологию от образца ГФИП-ДХМ-1:9. Промежуточное соотношение ГФИП-ДХМ-2:8 демонстрирует смешанную морфологию пор – как крупные овальные, так и мелкие округлые поры равномерно распределены по всей поверхности волокна, что может отражать изменение кинетики фазового разделения и затвердевания струи при данном составе смеси.

Средний диаметр волокон в данной серии образцов составил: 1000 ± 300 нм (ГФИП-ДХМ-1:9), 900 ± 100 нм (ГФИП-ДХМ-2:8) и 1300 ± 200 нм (ГФИП-ДХМ-3:7).

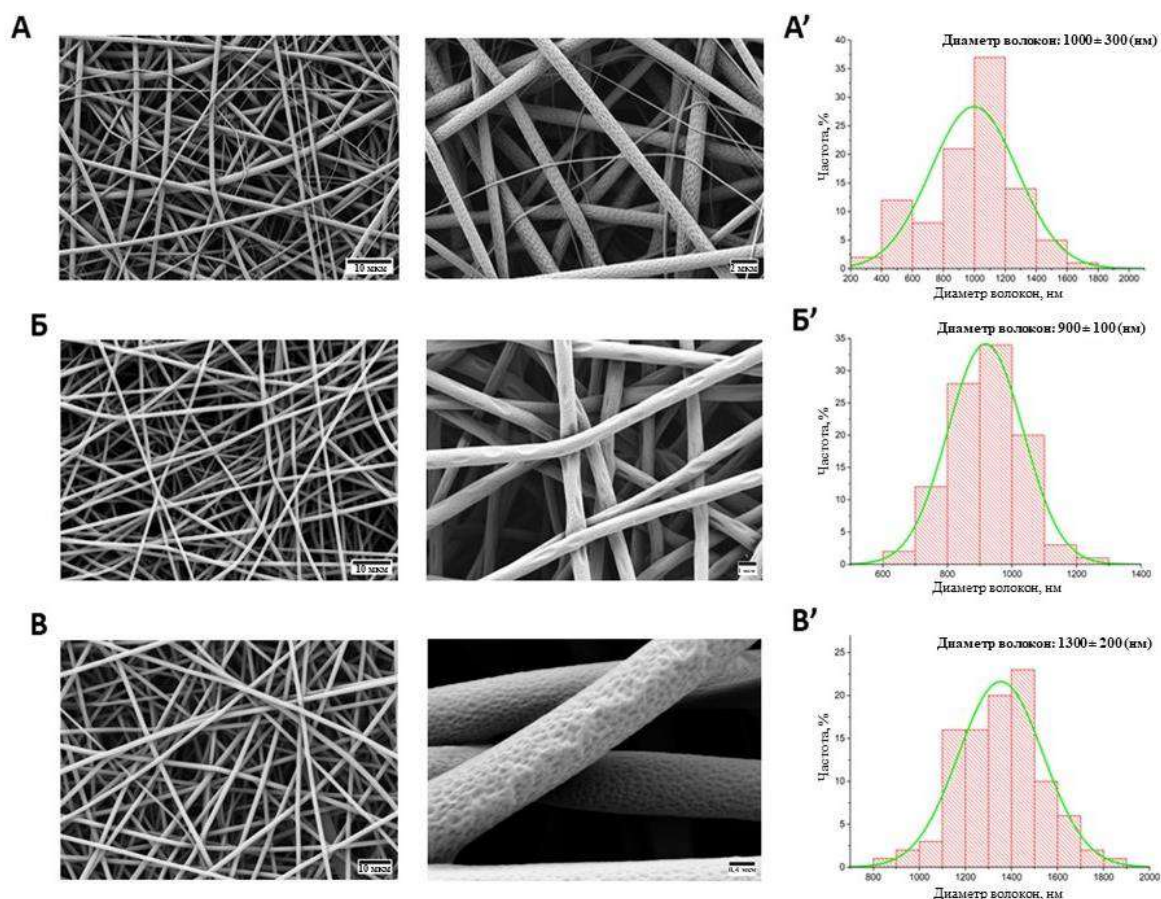


Рисунок 24 – СЭМ-микрофотографии: (А) ПЛА-ГФИП-ДХМ 1:9, (Б) ПЛА-ГФИП-ДХМ 2:8, (В) ПЛА-ГФИП-ДХМ 3:7. Средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ SD), показанные на рисунках (А', Б', В')

Необходимо учитывать остаточное количество растворителей в материале после электроформования. Растворители с высокой температурой кипения ($>100\text{ }^{\circ}\text{C}$) часто требуют дополнительных этапов удаления, таких как вакуумная сушка, осаждение или поэтапное испарение, для минимизации потенциальных неблагоприятных биологических эффектов [49]. В некоторых случаях полное удаление растворителя не всегда возможно из-за ограничений, связанных с составом материала. Сообщалось, что неполное удаление растворителя негативно влияет на клеточные реакции на полимерные материалы [50,51].

Растворители с температурой кипения выше $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ зачастую требуют дополнительных этапов удаления – вакуумной сушки, осаждения или ступенчатого испарения – с целью минимизации потенциальных неблагоприятных биологических эффектов [49]. В ряде случаев полное удаление растворителя технически недостижимо вследствие ограничений, накладываемых составом материала; при этом показано, что неполное удаление растворителя негативно сказывается на клеточном ответе на полимерные материалы [50,51].

Содержание остаточного растворителя также определяется температурой стеклования используемого полимера [52]: при электроформовании, проводимом при температурах ниже T_g , ограниченная подвижность полимерных цепей замедляет испарение растворителя, приводя к повышенному его содержанию в матриксе, тогда как формирование материала при температуре выше T_g может облегчать диффузионный выход растворителя благодаря более высокой сегментальной подвижности полимера.

Морфология волокон определяется также полимерным составом матриксов, на который влияют фазовая совместимость компонентов и их концентрация в растворе [53]. Дальнейшие результаты настоящей работы основаны преимущественно на системе растворителей ПЛА-ДТ, для которой характерно формирование приповерхностных пор, представляющих интерес для последующего применения в методе коаксиального электроформования: наличие такой пористости способно влиять на кинетику высвобождения биоактивных компонентов, адгезию клеток и, соответственно, на их прикрепление и пролиферацию на поверхности матрикса. Дополнительным преимуществом указанной системы является более низкая температура кипения используемых растворителей, отсутствие детектируемого сигнала хлора по данным ЭДС, что указывает на содержание остаточного ДХМ ниже предела обнаружения метода в отличие от образцов, полученных с использованием ГФИП.

Таким образом, выбор системы растворителей существенно влияет как на диаметр, так и на поверхностную морфологию ПЛА-волокон. Система ДТ обеспечивает формирование наиболее выраженной пористой поверхности среди выбранных для дальнейшего исследования составов и поэтому была использована как основная система растворителей на последующих этапах работы.

3.2 Влияние ПАВ и гиалуроната натрия на морфологию ПЛА-волокон и ее изменение при инкубации в модельных средах

Помимо оценки морфологии исходных матриксов на основе полилактида, представляло интерес изучить влияние поверхностно-активного вещества (кокогликозида, ПАВ) и гиалуроната натрия (ГН) на структуру и стабильность электроформованных волокон в процессе их деградации в модельных средах – фосфатно-солевом буфере (PBS) и реактиве Фентона. Для этого была получена серия волокнистых матриксов на основе ПЛА с использованием двух систем растворителей – чистого ГФИП и смеси ДТ – как в присутствии, так и в отсутствие ПАВ, а также с добавлением гиалуроната натрия в концентрациях 10 и 20 об.% (ГН10, ГН20) в комбинации с ПАВ и без него. Морфологию волокон и их структурную стабильность оценивали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) до деградации и на 40-е сутки инкубации в PBS и растворе Фентона, с последующим построением гистограмм распределения диаметров волокон.

СЭМ-микрофотографии матрикса ПЛА–ГФИП (рисунок 25) демонстрируют однородный матрикс, состоящий из гладких волокон, как в исходном состоянии, так и после экспозиции в PBS и растворе Фентона в течение 40 суток. Средний диаметр исходных волокон составил 1300 ± 250 нм; после деградации в PBS диаметр составлял 1200 ± 150 нм, а после экспозиции в растворе Фентона – до 1100 ± 150 нм, что также сопровождалось сужением распределения (уменьшением SD). После инкубации в растворе Фентона наблюдалось уменьшение среднего диаметра волокон. Это свидетельствует об изменении морфологии волокон в условиях окислительного воздействия, однако по данным СЭМ невозможно однозначно установить механизм потери материала.

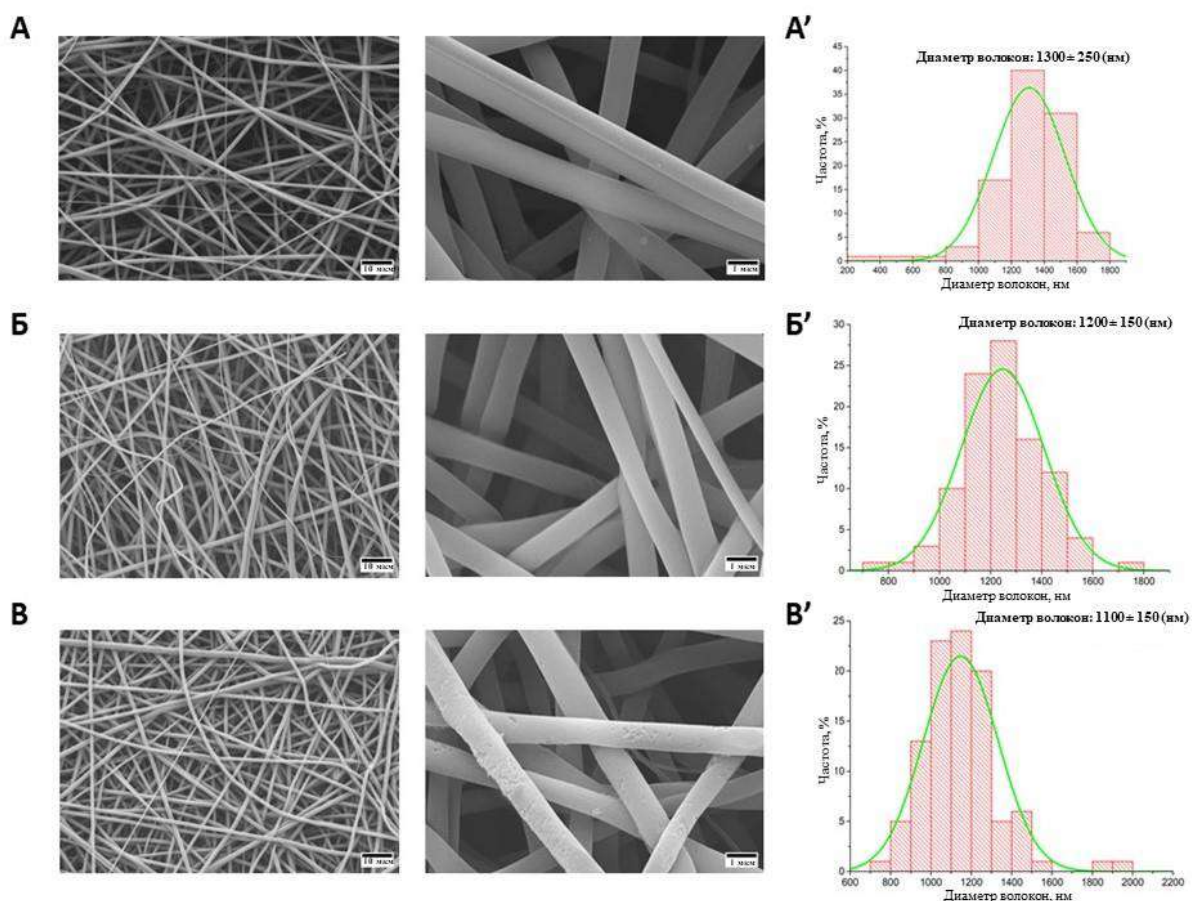


Рисунок 25 – СЭМ–микрофотографии полимерных матриц до и после деградации в растворе PBS и Фентона: (А) ПЛА–ГФИП–изначальный материал, (Б) ПЛА–ГФИП–PBS, 40–й день, (В) ПЛА–ГФИП–Фентон, 40–й день. Средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ SD), показанные на рисунках (А', Б', В')

Введение ПАВ в систему ПЛА–ГФИП (рисунок 26) привело к уменьшению среднего диаметра волокон – до 630 ± 130 нм в исходном состоянии, то есть почти в два раза относительно матрикса без ПАВ. Такое уменьшение диаметра может быть связано с изменением поверхностного натяжения, проводимости и реологических свойств раствора при введении ПАВ, что влияет на степень вытягивания струи в электрическом поле. Морфология волокон ПЛА–ГФИП–ПАВ оставалась гладкой даже после 40 дней; диаметр волокон закономерно снижался в ходе деградации – до 600 ± 130 нм в PBS и 500 ± 80 нм в растворе Фентона к 40-м суткам, что демонстрирует сохранение тенденции к поверхностной эрозии независимо от присутствия ПАВ.

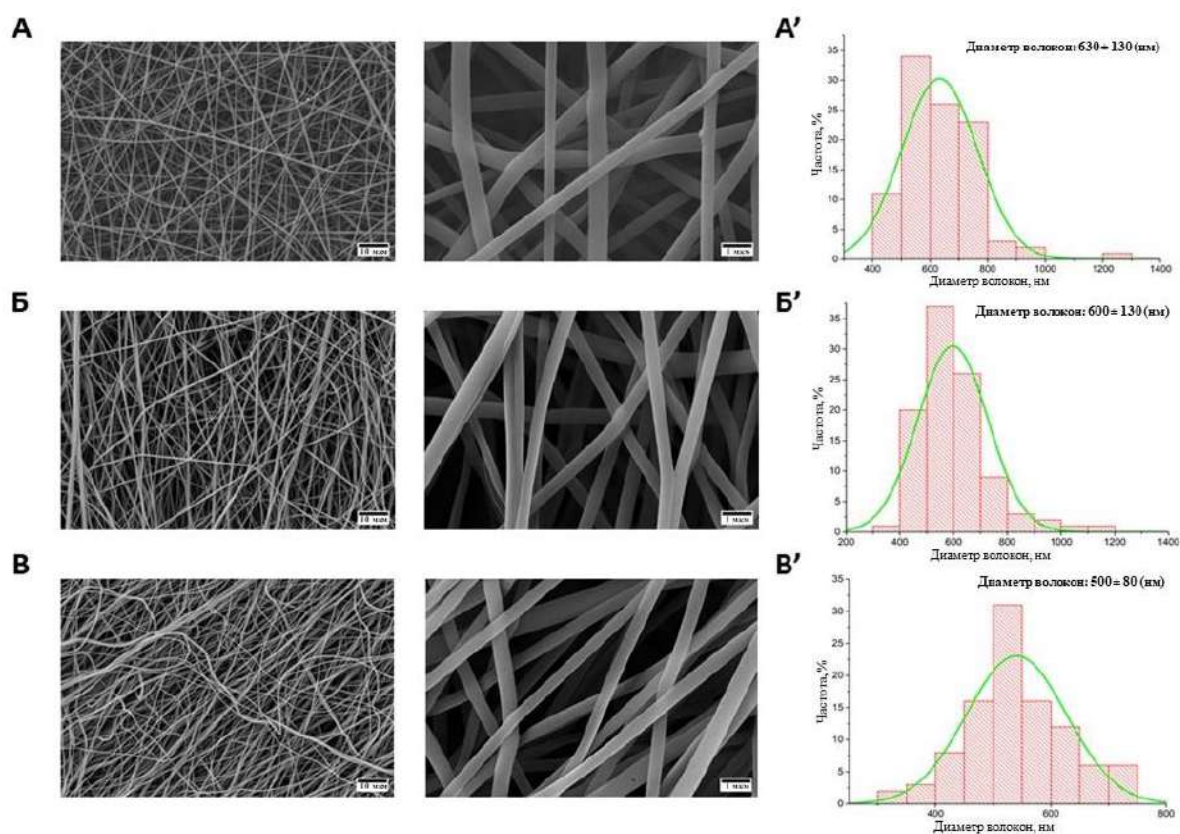


Рисунок 26 – СЭМ–микрофотографии полимерных матриц до и после деградации в растворе PBS и Фентона: (А) ПЛА–ГФИП–ПАВ–изначальный материал, (Б) ПЛА–ГФИП–ПАВ–PBS, 40–й день (В) ПЛА–ГФИП–ПАВ–Фентон, 40–й день. Средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ SD), показанные на рисунках (А', Б', В')

Диаметр исходных волокон в матрикс ПЛА–ДТ (рисунок 27), составил 2300 ± 615 нм, что почти вдвое превышает диаметр волокон, полученных из раствора в ГФИП. Такое различие объясняется разной скоростью испарения и диэлектрическими свойствами растворителей, определяющих степень вытягивания струи в процессе электроформования. В ходе деградации диаметр волокон ПЛА–ДТ постепенно снижался – до 1950 ± 400 нм в PBS и до 1500 ± 300 нм в растворе Фентона на 40-е сутки, что свидетельствует о более выраженной эрозии крупных волокон в окислительной среде. Также стоит отметить, что по результатам СЭМ, волокна в растворе Фентона на 40-е сутки имеют повреждения на поверхности в сравнении с исходным материалом.

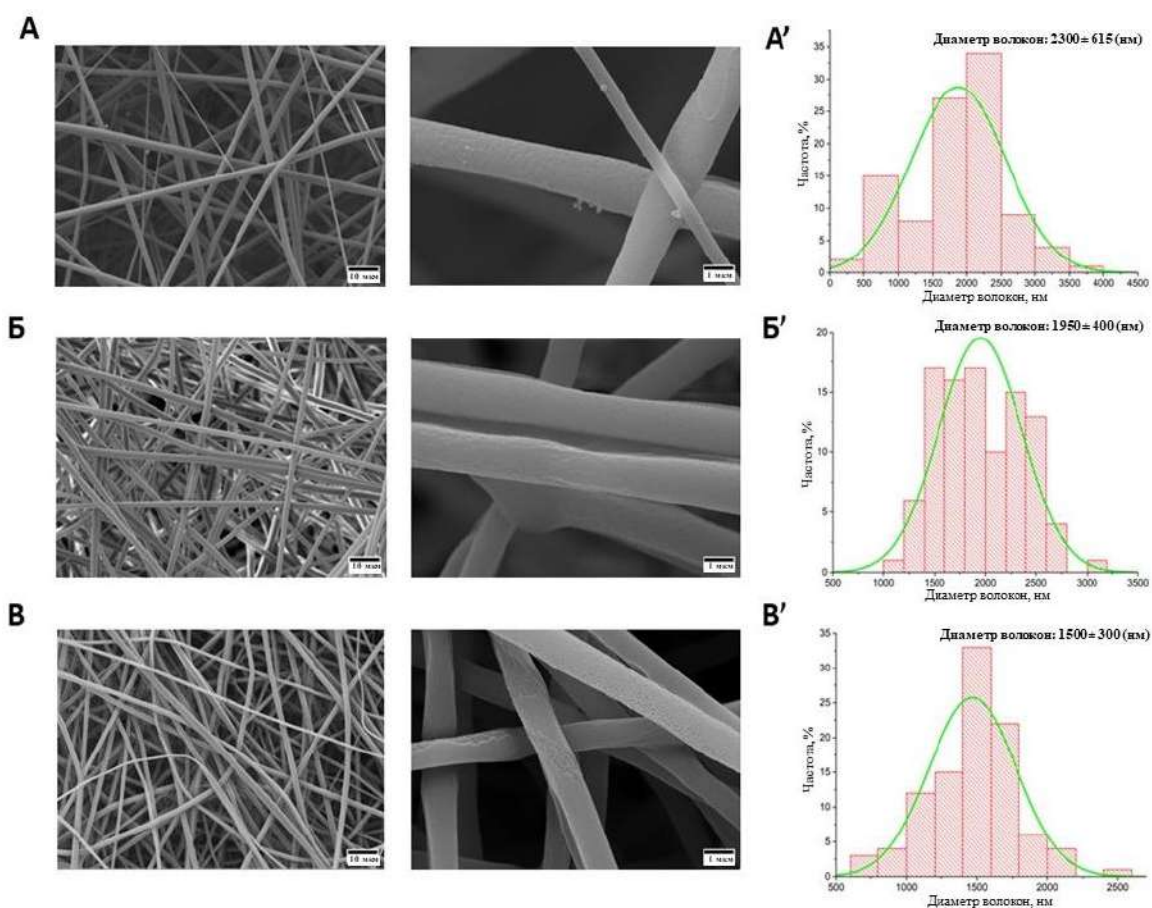


Рисунок 27 – СЭМ-микрофотографии полимерных матриц до и после деградации в растворе PBS и Фентона: (А) ПЛА–ДТ, изначальный материал, (Б) ПЛА–ДТ–PBS, 40-й день, (В) ПЛА–ДТ–Фентон, 40-й день. Средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ SD), показанные на рисунках (А', Б', В')

Добавление ПАВ к системе ПЛА–ДТ (рисунок 28) не привело к столь же заметному уменьшению диаметра волокон, как в случае системы на основе ГФИП: исходный диаметр составил 2300 ± 615 нм, практически не отличаясь от матрикса без ПАВ. Однако характер изменения диаметра в ходе деградации оказался иным: в PBS диаметр незначительно снизился до 2000 ± 600 нм, тогда как в растворе Фентона диаметр не уменьшился, а фактически остался на исходном уровне (2300 ± 450 нм) при заметном сужении распределения. Тот факт, что для ПЛА–ДТ–ПАВ средний диаметр волокон после инкубации в растворе Фентона практически не изменялся несмотря на выраженную потерю массы материала показывает, что потеря массы в данной системе не сопровождается пропорциональным уменьшением диаметра сохранившихся волокон. Определение конкретного механизма деградации потребовало бы дополнительных данных о молекулярной массе и химической структуре полимера (см. раздел 3.3).

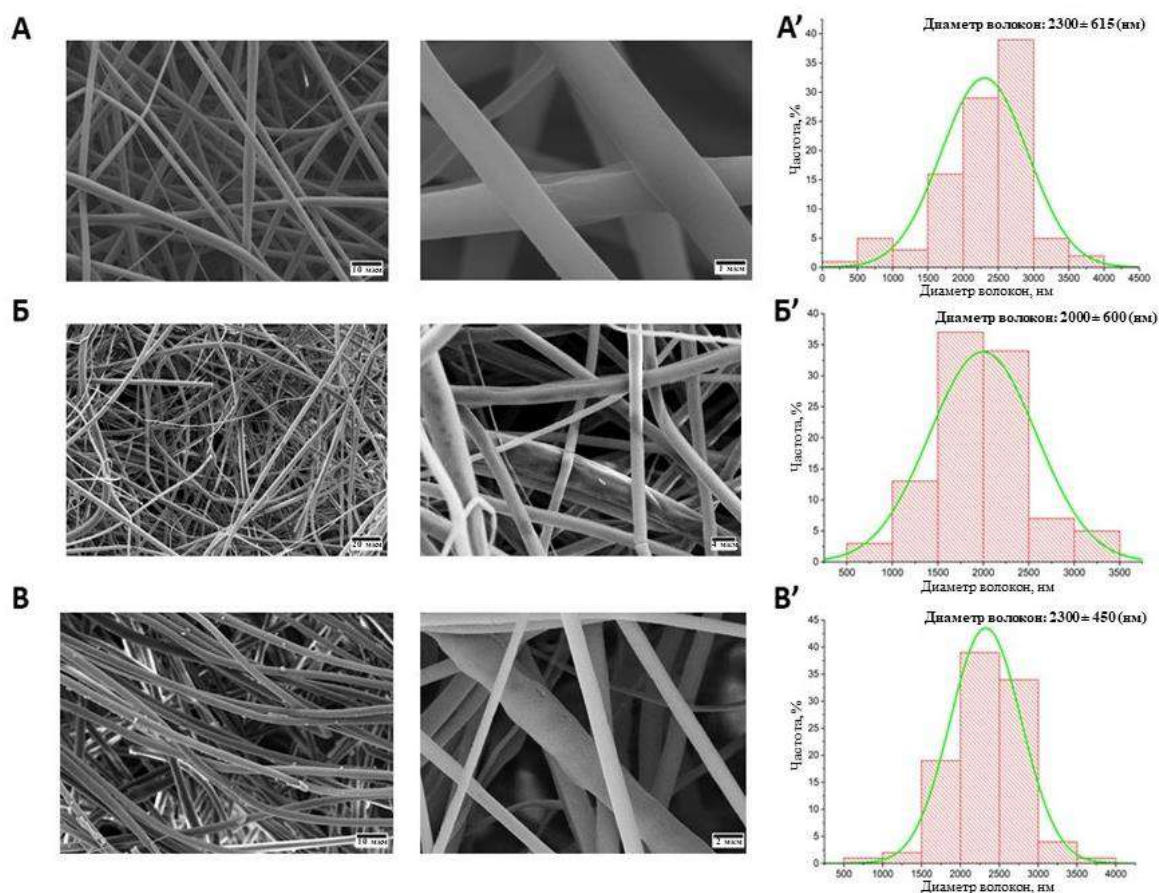


Рисунок 28 – СЭМ–микрофотографии полимерных матриц до и после деградации в растворе PBS и Фентона: (А) ПЛА–ДТ–ПАВ, изначальный материал, (Б) ПЛА–ДТ–ПАВ–PBS, 40–й день, (В) ПЛА–ДТ–ПАВ–Фентон, 40–й день. Средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ SD), показанные на рисунках (А', Б', В')

Введение 10 об.% гиалуроната натрия сопровождалось уменьшением среднего диаметра волокон с 2300 ± 615 до 700 ± 250 нм. Возможной причиной такого эффекта является изменение электрических и реологических свойств формируемой системы при введении полиэлектролитного компонента; однако для установления механизма необходимы непосредственные измерения проводимости и вязкости раствора.

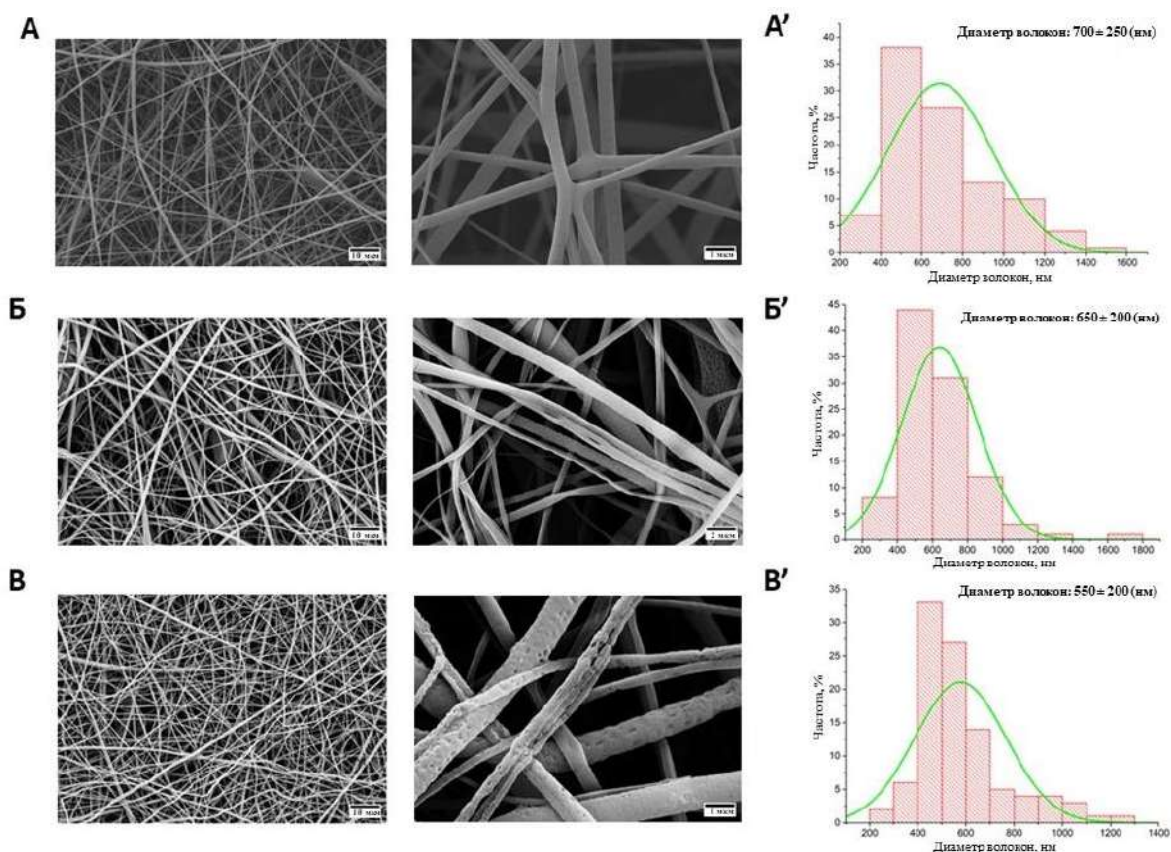


Рисунок 29 – СЭМ–микрофотографии полимерных матриц до и после деградации в растворе PBS и Фентона: (А) ПЛА–ДТ–ГН10, изначальный материал, (Б) ПЛА–ДТ–ГН10%–PBS, 40–й день, (В) ПЛА–ДТ–ГН10%–Фентон, 40–й день. Средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ SD), показанные на рисунках (А', Б', В')

При комбинировании ГН10% с ПАВ (рисунок 30) диаметр волокон остался в том же диапазоне (700 ± 300 нм исходно), что указывает на отсутствие выраженного эффекта ПАВ и ГН при данной концентрации гиалуроната. В обеих группах (ГН10% и ГН10%–ПАВ) диаметр волокон закономерно снижался в процессе деградации в PBS и особенно в растворе Фентона (до 550 ± 200 и 500 ± 130 нм соответственно), что согласуется с общей тенденцией поверхностной эрозии, характерной для гидрофилизованных матриц.

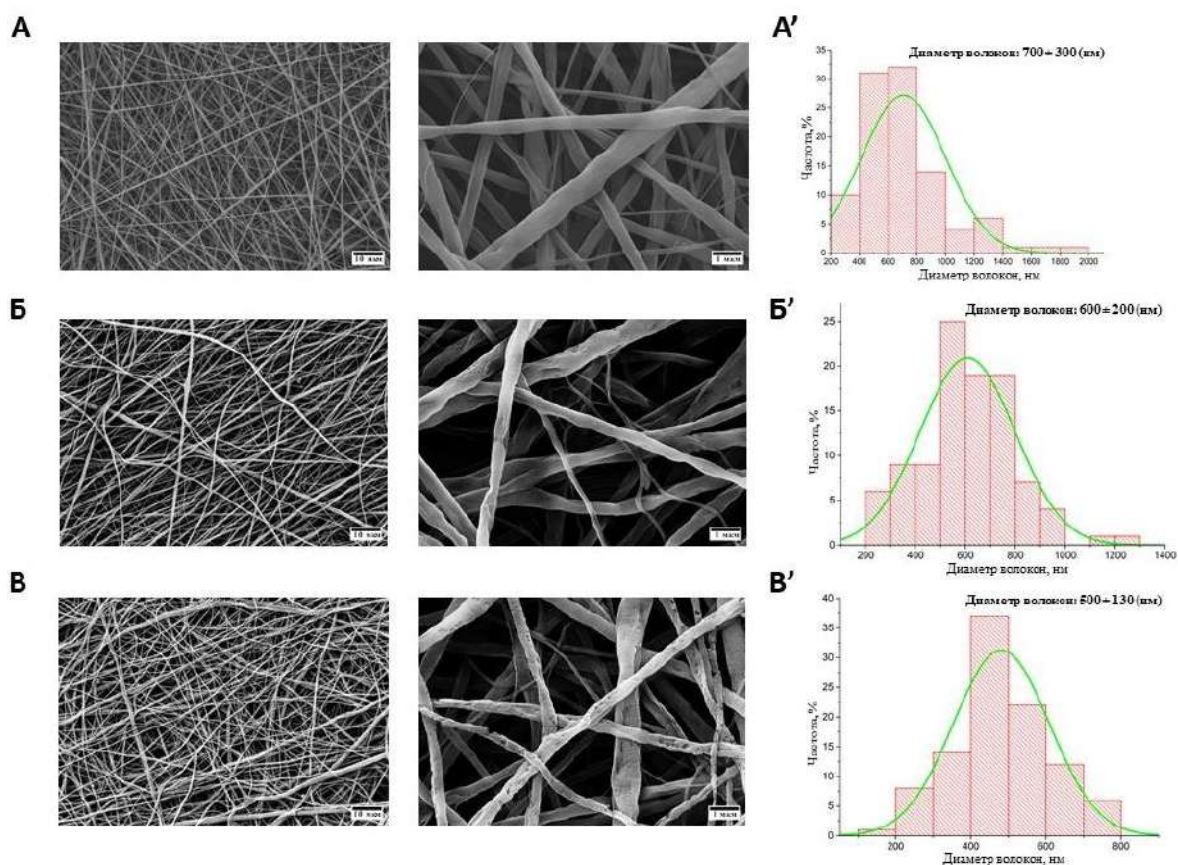


Рисунок 30 – СЭМ–микрофотографии полимерных матриц до и после деградации в растворе PBS и Фентона: (А) ПЛА–ДТ–ГН10–ПАВ, изначальный материал, (Б) ПЛА–ДТ–ГН10%–ПАВ–PBS, 40–й день, (В) ПЛА–ДТ–ГН10%–ПАВ–Фентон, 40–й день. Средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ SD), показанные на рисунках (А', Б', В')

При повышении концентрации гиалуроната натрия до 20% (рисунок 31) средний диаметр волокон практически не изменился относительно ГН10% (700 ± 300 нм исходно), однако характер изменения диаметра в ходе деградации оказался нетипичным: в отличие от всех остальных исследованных составов, диаметр волокон ПЛА–ДТ–ГН20% не уменьшался, а незначительно увеличивался – до 800 ± 300 нм после экспозиции в растворе Фентона. Наблюдаемое увеличение среднего диаметра может быть связано с набуханием гидрофильной компоненты и/или с особенностями отбора сохранившихся волокон для анализа; имеющиеся СЭМ–данные не позволяют однозначно различить эти механизмы.

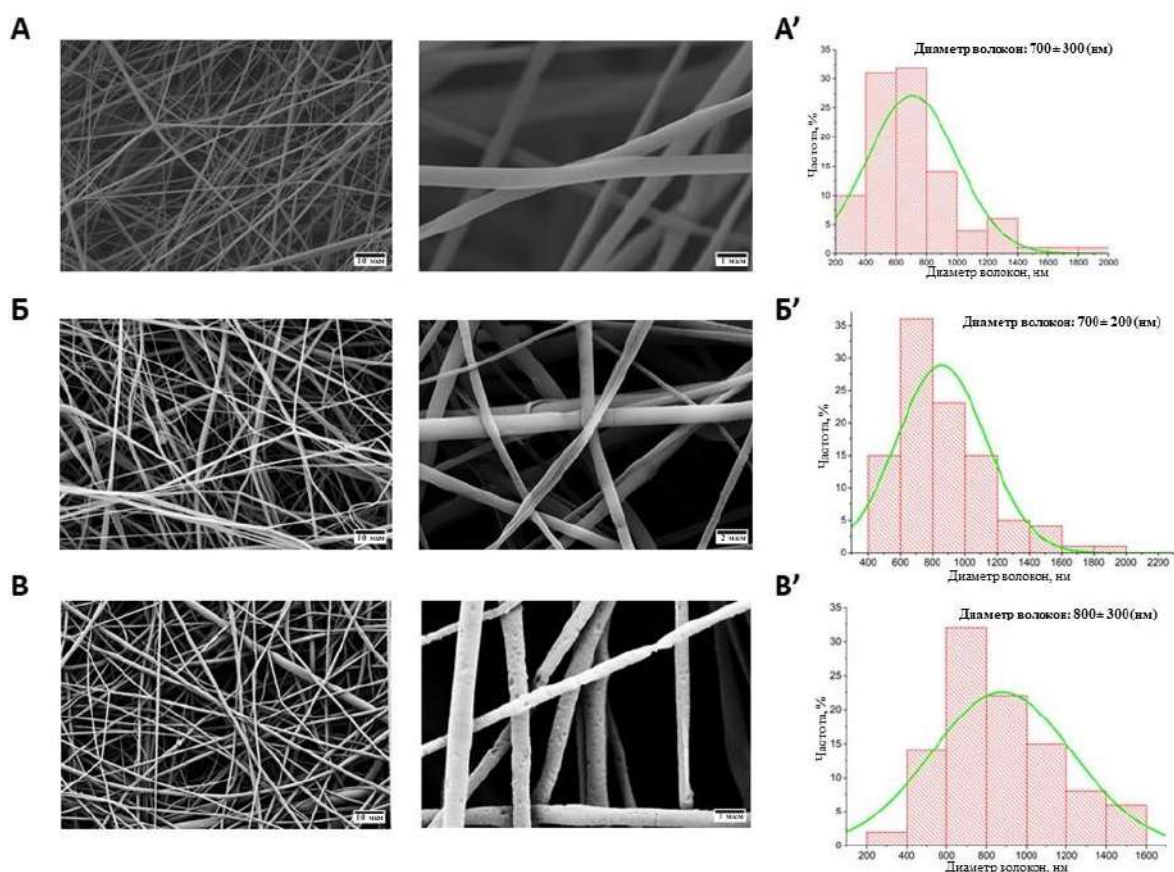


Рисунок 31 – СЭМ–микрофотографии полимерных матриц до и после деградации в растворе PBS и Фентона: (А) ПЛА–ДТ–ГН20%, изначальный материал, (Б) ПЛА–ДТ–ГН20%–PBS, 40–й день, (В) ПЛА–ДТ–ГН20%–Фентон, 40–й день. Средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ SD), показанные на рисунках (А', Б', В')

Комбинация ГН20% с ПАВ (рисунок 32) давала волокна сходного исходного диаметра (750 ± 250 нм) с более выраженным, чем в чистой группе ГН20%, снижением диаметра в ходе деградации – до 600 ± 150 нм в растворе Фентона, – что указывает на частичное восстановление типичной для ПАВ-содержащих систем тенденции к поверхностному истончению волокна даже при высоком содержании гиалуроната.

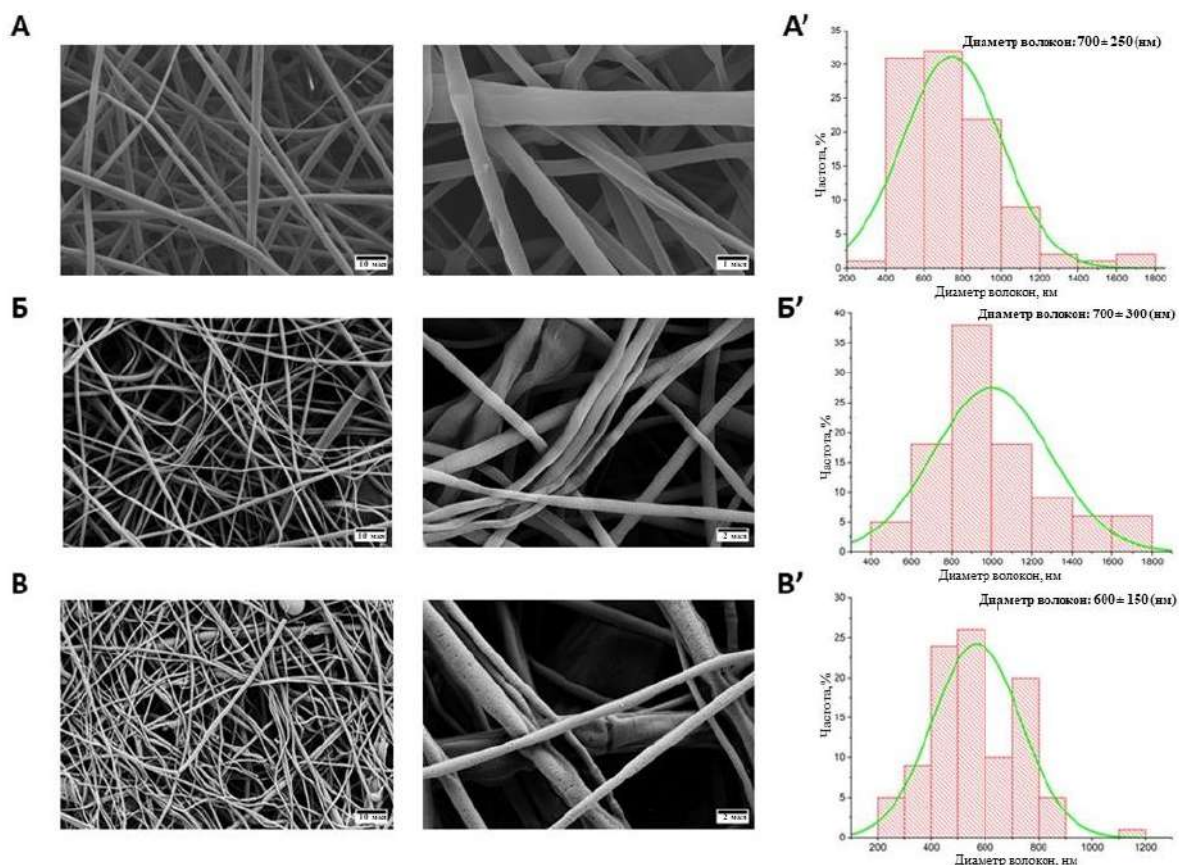


Рисунок 32 – СЭМ–микрофотографии полимерных матриц до и после деградации в растворе PBS и Фентона: (А) ПЛА–ДТ%–ГН20–ПАВ, изначальный материал, (Б) ПЛА–ДТ–ГН20%–ПАВ–PBS, 40–й день, (В) ПЛА–ДТ–ГН20%–ПАВ–Фентон, 40–й день. Средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ SD), показанные на рисунках (А', Б', В')

Во всех исследованных группах, независимо от состава, СЭМ-микрофотографии не выявили признаков грубого разрушения, растрескивания или фрагментации волокон на 40-е сутки инкубации в PBS, но в растворе Фентона – на волокна матрикса наблюдались повреждения, что говорит о различиях в скорости деградации материалов в разных средах.

3.3 Потеря массы ПЛА-матриц при инкубации в PBS и растворе Фентона

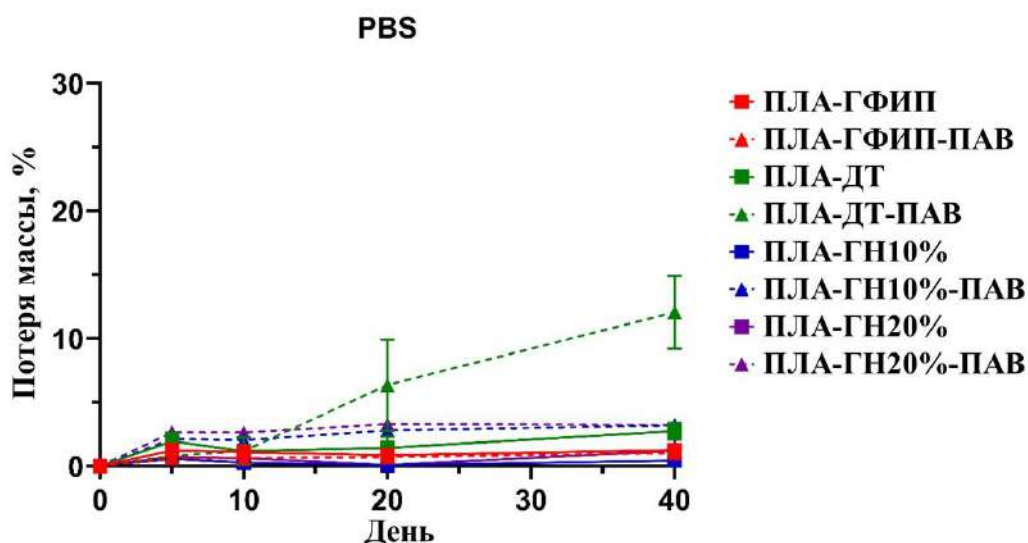
Для количественной оценки стабильности матриц различного состава была определена потеря массы после инкубации в PBS и растворе Фентона в течение 40 суток. PBS использовали как модель нейтральной водной среды, а раствор Фентона – как модель ускоренного окислительного воздействия. Измерения проводились на протяжении 40 суток с промежуточными точками на 5-е, 10-е и 20-е сутки.

В условиях гидролитической деградации в PBS (рисунок 33А) большинство исследованных составов – ПЛА–ГФИП, ПЛА–ГФИП–ПАВ, ПЛА–ДТ, ПЛА–ГН-10, ПЛА–ГН-10%–ПАВ, ПЛА–ГН-20 и ПЛА–ГН-20%–ПАВ – демонстрировали медленную и монотонную

потерю массы, не превышающую 3% к 40-м суткам эксперимента, что типично для объемной гидролитической эрозии сложноэфирных связей ПЛА в нейтральной буферной среде при относительно коротких сроках инкубации. Единственным заметным исключением стал состав ПЛА–ДТ–ПАВ, потеря массы которого резко возрастала начиная с 10–20-х суток и достигала $12,0 \pm 2,9\%$ к 40-м суткам – то есть в 4–10 раз превышала показатели всех остальных групп. Такое ускорение деградации именно в комбинации системы растворителей ДТ и ПАВ, при отсутствии аналогичного эффекта у ПЛА–ГФИП–ПАВ, позволяет предположить, что сочетание морфологии пористых волокон (характерной для системы ДТ) с повышенной гидрофильностью поверхности (за счет ПАВ) создает условия для более ускоренного гидролиза.

В окислительной среде реактива Фентона (рисунок 33Б) общая скорость потери массы была выше, чем в PBS, практически для всех групп, что ожидаемо с учетом дополнительного вклада радикального механизма деструкции макроцепей ПЛА гидроксильными радикалами ($\cdot\text{OH}$). Большинство составов (ПЛА–ГФИП, ПЛА–ГФИП–ПАВ, ПЛА–ДТ, группы с гиалуронатом) демонстрировали потерю массы в диапазоне 3–6% к 40-м суткам. Наиболее выраженный эффект вновь наблюдался для образца ПЛА–ДТ–ПАВ, потеря массы которого достигала 18,8% к 40-м суткам – максимальное значение среди всех исследованных составов, что подтверждает существенно меньшую стабильность данного состава в обеих исследованных средах. Повышенный разброс экспериментальных значений для этой группы указывает также на повышенную вариабельность процесса деградации, что может быть связано с гетерогенностью распределения ПАВ в объеме материала, а также с разными диаметрами волокон системы ДТ.

А



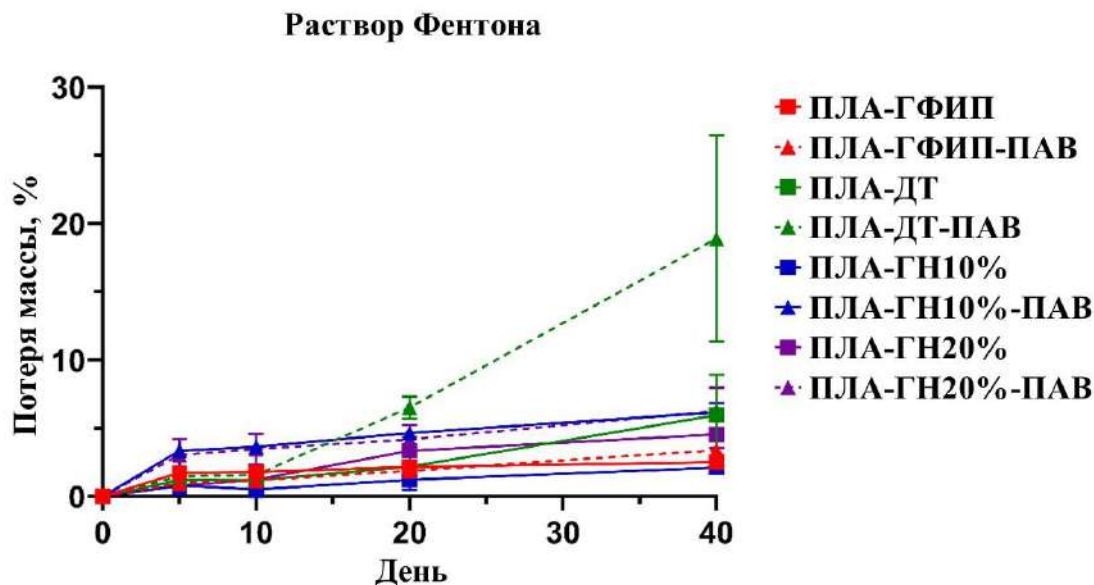
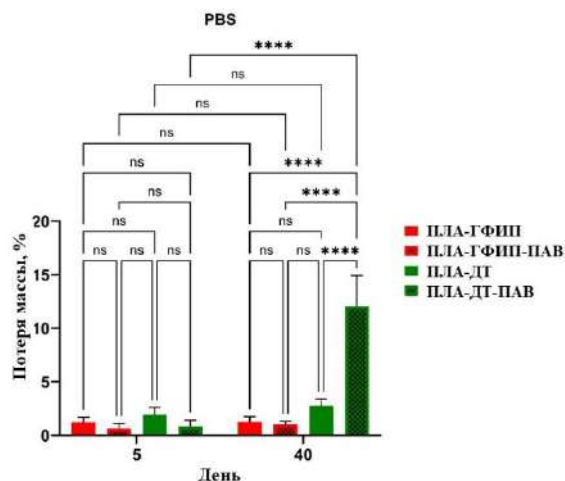


Рисунок 33 – Кинетика потери массы матриц: группа А исследование в растворе PBS, группа Б исследование в растворе Фентона

Статистический анализ методом двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с последующим множественным сравнением по критерию Тьюки подтвердил, что различия в потере массы между группами ПЛА–ГФИП/ПЛА–ГФИП–ПАВ и ПЛА–ДТ/ПЛА–ДТ–ПАВ на 5-е сутки эксперимента статистически незначимы (рисунок 34, $p \geq 0,05$ для всех попарных сравнений), тогда как к 40-м суткам образец ПЛА–ДТ–ПАВ статистически значимо отличается от всех остальных групп данного блока ($p < 0,0001$). Это означает, что ускоряющий эффект ПАВ на деградацию проявляется не сразу, а накапливается со временем инкубации, что типично для процессов эрозии, зависящих от постепенного увеличения площади и глубины проникновения деградирующей среды в полимер.

А



Б

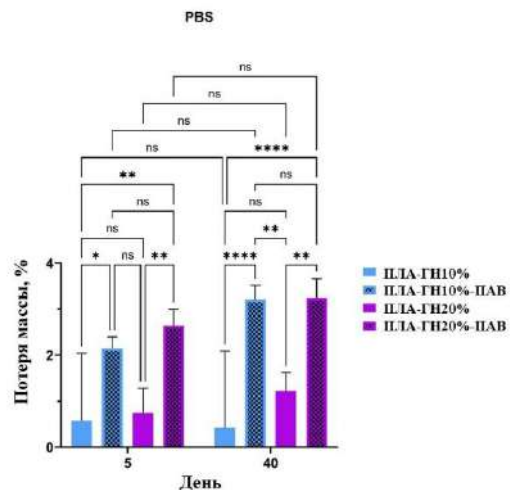


Рисунок 34 – Статистический анализ скорости потери массы между группами 5-го и 40-го дня в растворе PBS; А – группа ПЛА-ГФИП (ПАВ), ПЛА-ДТ (ПАВ), В – группа ПЛА-ДТ с добавлением гиалуроната натрия (ГН). Данные представлены как среднее $\pm$ SEM ($n = 5$). Статистическая значимость различий между группами оценивалась методом двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с последующим тестом Тьюки (Tukey's multiple comparisons test) для сравнения всех пар групп внутри каждой временной точки. Обозначения значимости: **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns – различия статистически незначимы ($p \geq 0,05$)

Для группы образцов, содержащих гиалуронат натрия (рисунок 34 Б), статистически значимые различия между составами с ПАВ и без него были выявлены уже на 5-е сутки (ПЛА-ГН-10% против ПЛА-ГН-10%-ПАВ: $p < 0,05$; ПЛА-ГН-10% против ПЛА-ГН-20%-ПАВ: $p < 0,01$), а к 40-м суткам оба состава с ПАВ (ГН10%-ПАВ и ГН20%-ПАВ) демонстрировали статистически значимо более высокую потерю массы по сравнению с соответствующими составами без ПАВ ($p < 0,0001$ и $p < 0,01$ соответственно). Вместе с тем абсолютная величина потери массы в этой группе (не более 3,5% к 40-м суткам) оставалась значительно ниже, чем в системе ПЛА-ДТ-ПАВ без гиалуроната (12%). Таким образом, введение гиалуроната изменяет влияние ПАВ на стабильность многокомпонентного матрикса. Механизм этого эффекта на основании только данных по потере массы установить невозможно.

В условиях ускоренной окислительной деградации в растворе Фентона статистические различия между исследуемыми составами были выражены сильнее, чем при инкубации в PBS (рисунок 35). На 5-е сутки различия между образцами ПЛА-ГФИП, ПЛА-ГФИП-ПАВ, ПЛА-ДТ и ПЛА-ДТ-ПАВ были статистически незначимыми ($p \geq 0,05$; рисунок 35А). К 40-м суткам потеря массы ПЛА-ДТ-ПАВ достигала 18,8%, что являлось максимальным значением среди рассмотренных составов. Этот образец статистически значимо отличался от ПЛА-ДТ и

материалов серии ПЛА–ГФИП ($p < 0,0001$). При сравнении результатов на 5-е и 40-е сутки для ПЛА–ДТ и особенно для ПЛА–ДТ–ПАВ был выявлен статистически значимый рост потери массы, тогда как для матриц на основе ГФИП различия не достигали уровня статистической значимости даже на 40-й день. Полученные результаты подтверждают, увеличение потери массы при введении ПАВ наиболее выражено в сочетании с системой растворителей ДХМ/ТГФ. Для матриц, содержащих гиалуронат натрия, введение ПАВ также сопровождалось повышением потери массы в растворе Фентона (рисунок 35Б). На 5-е сутки потеря массы ПЛА–ДТ–ГН-10%–ПАВ была статистически значимо выше, чем у ПЛА–ДТ–ГН-10% ($p < 0,001$), а для образцов с 20% гиалуроната натрия соответствующее различие составляло $p < 0,01$. К 40-м суткам различия между составами с ПАВ и без него сохранялись: для группы с 10% гиалуроната натрия уровень значимости составлял $p < 0,0001$, а для группы с 20% – $p < 0,05$. При этом между образцами ПЛА–ДТ–ГН-10%–ПАВ и ПЛА–ДТ–ГН-20%–ПАВ на 40-е сутки статистически значимых различий не выявлено ($p \geq 0,05$).

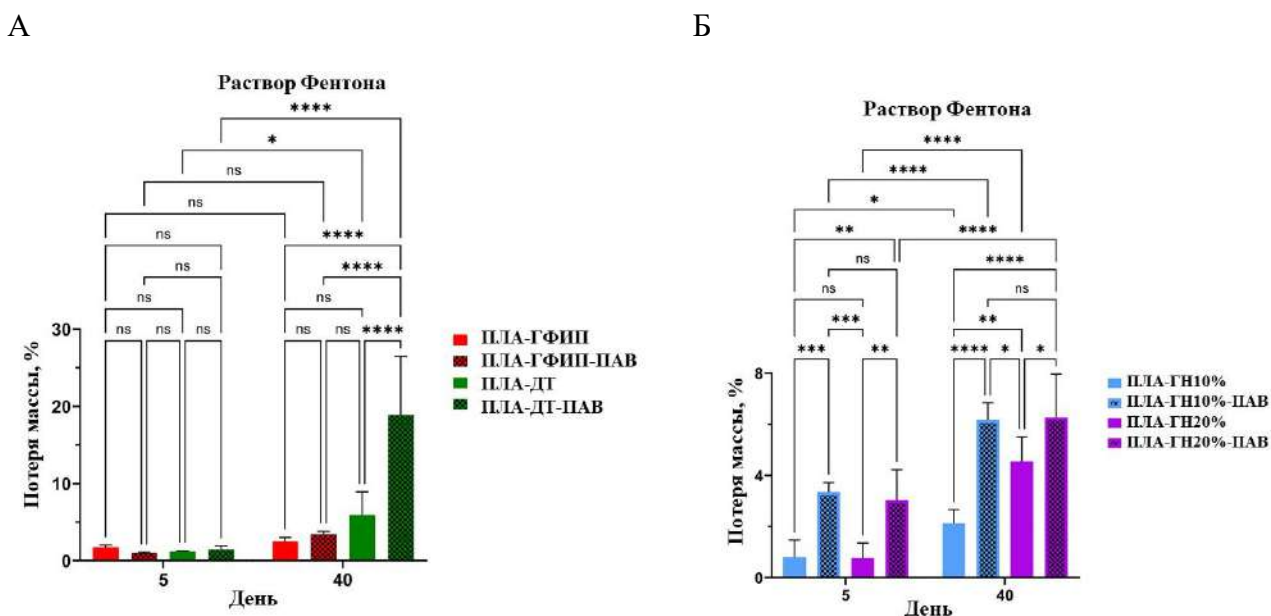


Рисунок 35 – Статистический анализ скорости деградации между группами 5-го и 40-го дня в растворе Фентона; А – группа ПЛА–ГФИП (ПАВ), ПЛА–ДТ (ПАВ), Б – группа ПЛА–ДТ с добавлением гиалуроната натрия (ГН). Данные представлены как среднее $\pm$ SEM ($n = 5$). Статистическая значимость различий между группами оценивалась методом двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с последующим тестом Тьюки (Tukey's multiple comparisons test) для сравнения всех пар групп внутри каждой временной точки. Обозначения значимости: **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns – различия статистически незначимы ($p \geq 0,05$).

Влияние ПАВ на морфологию волокон оказалось растворитель-зависимым (таблица 1): он значительно уменьшал диаметр волокон в системе на основе ГФИП, но не в системе ДТ, где определяющим фактором утончения выступал гиалуронат натрия. При этом сочетание ДТ с ПАВ без гиалуроната резко ускоряло деградацию матрикса как в PBS, так и в растворе Фентона, тогда как гиалуронат частично нивелировал это ускоряющее действие ПАВ. Таким образом, скорость биodeградации ПЛА-матрикса определяется не отдельными компонентами раствора, а их сочетанием, что позволяет целенаправленно подбирать состав под задачи с разным требуемым сроком сохранения каркаса – от длительно стабильных скаффолдов до материалов с более высокой скоростью потери массы в модельных деградационных средах.

Таблица 1 Средний диаметр волокон исходных образцов и после деградации в растворе Фентона и PBS

Образец	Исходный, нм	PBS, 40 дн., нм	Фентон, 40 дн., нм
ПЛА–ГФИП (рисунок 25)	1300 ± 250	1200 ± 150	1100 ± 150
ПЛА–ГФИП–ПАВ (рисунок 26)	630 ± 130	600 ± 130	500 ± 80
ПЛА–ДТ (рисунок 27)	2300 ± 615	1950 ± 400	1500 ± 300
ПЛА–ДТ–ПАВ (рисунок 28)	2300 ± 615	2000 ± 600	2300 ± 450
ПЛА–ДТ–ГН10% (рисунок 29)	700 ± 250	650 ± 200	550 ± 200
ПЛА–ДТ–ГН10%–ПАВ (рисунок 30)	700 ± 300	600 ± 200	500 ± 130
ПЛА–ДТ–ГН20% (рисунок 31)	700 ± 300	700 ± 200	800 ± 300
ПЛА–ДТ–ГН20%–ПАВ (рисунок 32)	750 ± 250	700 ± 300	600 ± 150

Таким образом, влияние ПАВ на стабильность ПЛА-матрикса существенно зависит от состава формируемой системы. Наиболее выраженная потеря массы наблюдалась для ПЛА–ДТ–ПАВ, тогда как введение гиалуроната натрия изменяло характер этого эффекта. Полученные результаты показывают возможность регулирования стабильности многокомпонентных матрикса путем изменения их состава, однако прямое прогнозирование скорости *in vivo* резорбции на основании данных модельных испытаний не представляется обоснованным.

3.4 Механические характеристики материалов на основе ПЛА, полученных методом смесового и эмульсионного электроформования

Механические свойства электроформованных матрикса оценивали методом одноосного растяжения с определением предела упругости, предела прочности при растяжении (UTS), модуля Юнга и относительного удлинения при разрыве (ϵ) для всех исследованных составов на

основе полилактида. Количественные данные представлены в таблице 2 и на кривых зависимости напряжения от деформации (рисунки 36, 37).

Матрикс ПЛА–ГФИП (рисунок 36) характеризовался наиболее высокой деформируемостью при одновременно высоких значениях прочности и модуля (таблица 2): $5,07 \pm 0,3$ МПа, условный предел упругости – $2,17 \pm 0,16$ МПа, модуль Юнга – $135 \pm 6,6$ МПа при относительном удлинении при разрыве $265 \pm 2\%$.

Введение ПАВ в систему ПЛА–ГФИП (рисунок 36) привело к выраженному ухудшению всех механических показателей (таблица 2): условный предел упругости снизился до $1,23 \pm 0,15$ МПа, предел прочности – до $3 \pm 0,8$ МПа, модуль Юнга – до $100 \pm 22,5$ МПа, а относительное удлинение при разрыве сократилось почти в 5 раз – до $56 \pm 8\%$. Можно отметить, что ПАВ в системе на основе ГФИП снижает прочность и существенно уменьшает деформацию при разрушении.

Матрикс ПЛА–ДТ (рисунок 36) характеризовался более низкими прочностными показателями по сравнению с ПЛА–ГФИП (предел прочности (таблица 2) $3,33 \pm 0,22$ МПа, условный предел упругости $1,1 \pm 0,14$ МПа, модуль Юнга $104 \pm 5,8$ МПа) при также сниженной, но все еще значительной деформируемости ($135 \pm 32\%$). Пониженная прочность и вдвое меньшее удлинение при разрыве по сравнению с ПЛА–ГФИП коррелируют с данными морфологического анализа (раздел 3.2), согласно которым волокна ПЛА–ДТ характеризуется более крупными волокнами и более широким распределением их диаметра, чем ПЛА–ГФИП. Эти морфологические различия могут вносить вклад в наблюдаемое снижение прочности и деформируемости матрикса, наряду с другими структурными факторами.

Материал с самыми низкими механическими характеристиками среди всех исследованных составов характерен для системы ПЛА–ДТ–ПАВ (рисунок 36) (таблица 2): условный предел упругости снизился до $0,05 \pm 0,004$ МПа, предел прочности – до $0,26 \pm 0,068$ МПа (более чем в 12 раз ниже, чем у ПЛА–ДТ без ПАВ), модуль Юнга упал до $14 \pm 3,6$ МПа, а относительное удлинение при разрыве сократилось до $25 \pm 10\%$. Резкое снижение прочности и жесткости матрикса ПЛА–ДТ–ПАВ согласуются с результатами исследования кинетики деградации данного состава (раздел 3.3), где именно ПЛА–ДТ–ПАВ демонстрировал ускоренную потерю массы как в PBS, так и в растворе Фентона. Совокупность этих результатов указывает на существенное изменение структурной организации матрикса при введении ПАВ в систему ДТ, однако установление конкретного механизма требует дополнительных структурных и физико-химических данных.

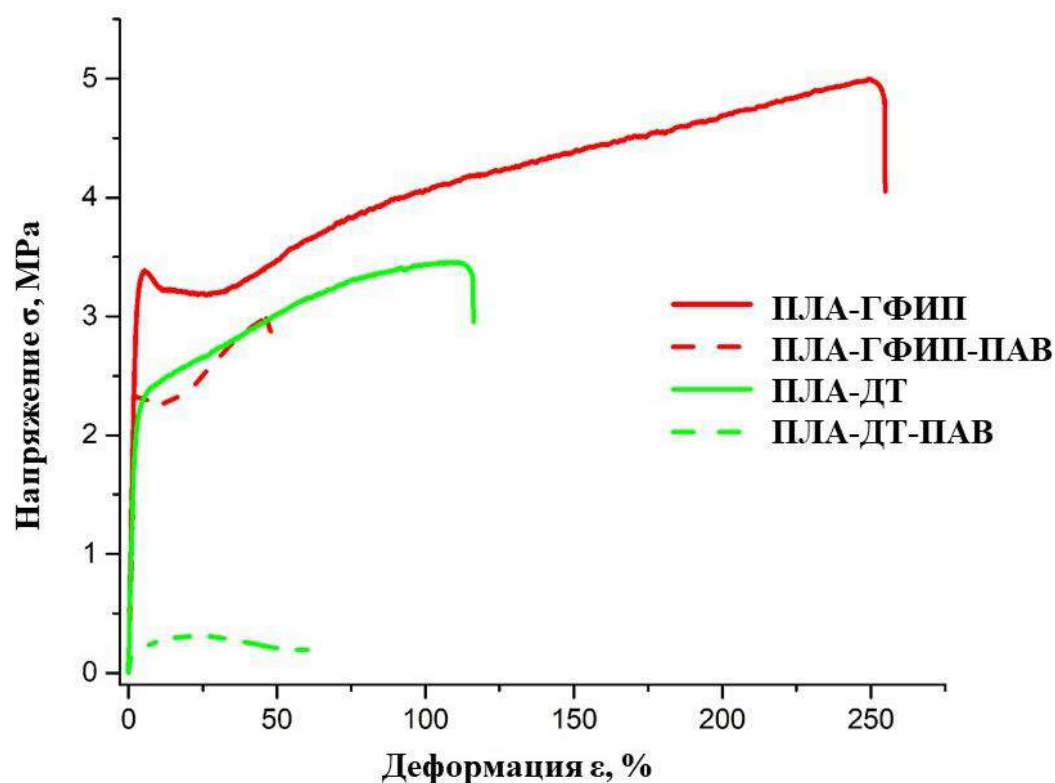


Рисунок 36 – Кривые зависимости напряжений от деформации ПЛА–ГФИП, ПЛА–ГФИП–ПАВ, ПЛА–ДТ и ПЛА–ДТ–ПАВ

Состав ПЛА–ДТ–ГН-10% (рисунок 37) показал пониженные механические характеристики (таблица 2) (условный предел упругости $0,43 \pm 0,17$ МПа, предел прочности $1 \pm 0,23$ МПа, модуль Юнга 29 ± 18 МПа, ε $26 \pm 3,7\%$) – заметно ниже, чем у ПЛА–ДТ без гиалуроната. Это свидетельствует о существенном влиянии гидрофильного компонента на механическое поведение матрикса.

Наиболее показательным результатом всей серии стал состав ПЛА–ДТ–ГН-10%–ПАВ (рисунок 37), который продемонстрировал резкое улучшение механических свойств относительно (таблица 2) ПЛА–ДТ–ГН-10% без ПАВ: условный предел упругости вырос более чем в 5 раз – до $2,35 \pm 0,8$ МПа, предел прочности – до 4 ± 1 МПа (в 4 раза выше), модуль Юнга – до 180 ± 17 МПа (максимальное значение среди всех исследованных составов, превышающее даже показатель ПЛА–ГФИП), при удлинении при разрыве $34 \pm 8,5\%$. Это принципиально отличается от эффекта ПАВ в системах без гиалуроната, где ПАВ во всех случаях снижал механические характеристики: при совместном присутствии с 10% гиалуроната ПАВ, напротив, выраженно упрочняет и повышает жесткость матрикса. Таким образом, присутствие ПАВ существенно изменяет механическое поведение матрикса, содержащего 10 об.% гиалуроната натрия, причем направление этого эффекта противоположно наблюдаемому для систем без ГН.

Такой эффект может быть связан с изменением морфологии и межфазной организации многокомпонентной системы в присутствии ПАВ. Для установления конкретного механизма необходимы дополнительные данные о распределении компонентов и межфазных взаимодействиях.

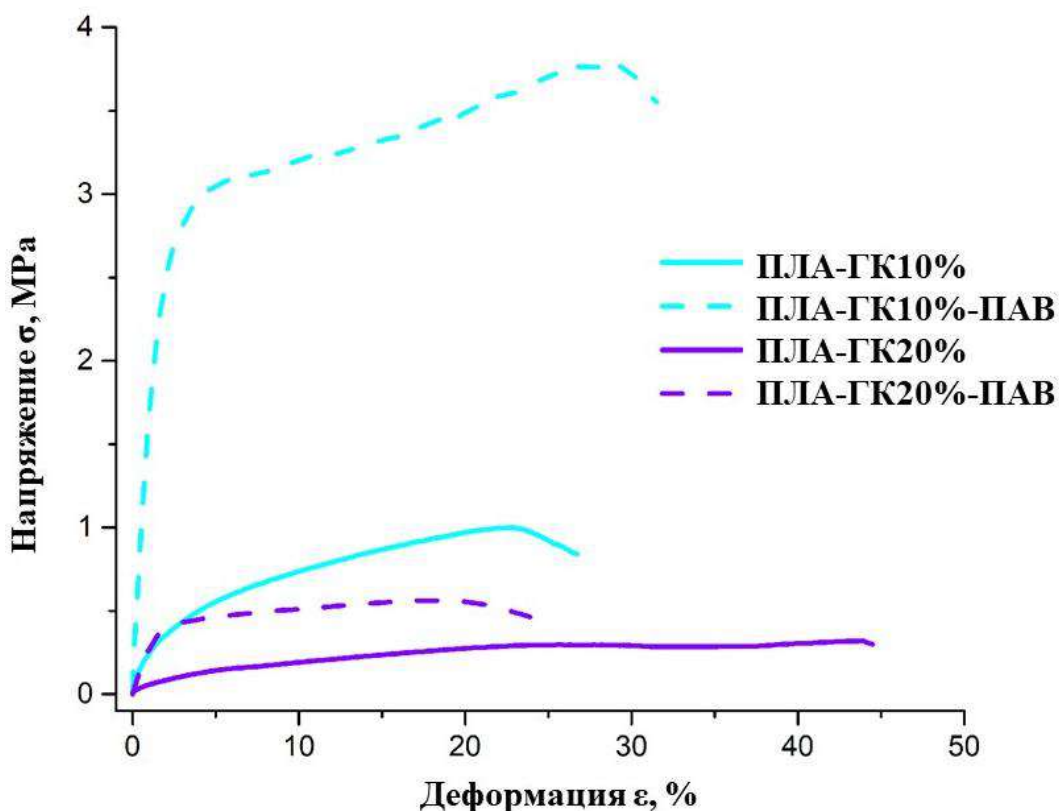


Рисунок 37 – Кривые зависимости напряжений от деформации ПЛА–ДТ–ГН–10% (ПАВ) и ПЛА–ДТ–ГН–20% (ПАВ)

При повышении содержания гиалуроната до 20% (рисунок 37) абсолютные значения прочности резко снижались независимо от присутствия ПАВ (таблица 2): для ПЛА–ДТ–ГН–20% условный предел упругости составил лишь $0,06 \pm 0,014$ МПа, предел прочности – $0,39 \pm 0,014$ МПа, модуль Юнга – $9,23 \pm 6,2$ МПа при удлинении $46 \pm 5,3\%$. Добавление ПАВ к этому составу (ПЛА–ДТ–ГН–20%–ПАВ) обеспечивало умеренное повышение показателей: условный предел упругости возрастал до $0,17 \pm 0,017$ МПа, предел прочности – до $0,63 \pm 0,084$ МПа, модуль Юнга – до $35,54 \pm 2$ МПа, однако удлинение при разрыве при этом снижалось до $22,66 \pm 5,4\%$. Таким образом, положительный модифицирующий эффект ПАВ, отчетливо выраженный при 10% гиалуроната, сохраняется и при 20% ГН в отношении прочности и жесткости. Увеличение

содержания гиалуроната натрия до 20 об.% сопровождалось существенным снижением механических характеристик независимо от присутствия ПАВ. Это указывает на существование диапазона состава, в котором положительное влияние ПАВ на прочность уже не компенсирует общего изменения структуры многокомпонентного матрикса.

Таблица 2 Механические характеристики полученных материалов.

Материал	Условный предел упругости, МПа	Предел прочности при растяжении, МПа	Модуль Юнга, МПа	ε , %
ПЛА–ГФИП	$2,17 \pm 0,16$	$5,07 \pm 0,3$	$135 \pm 6,6$	265 ± 2
ПЛА–ГФИП–ПАВ	$1,23 \pm 0,15$	$3 \pm 0,8$	$100 \pm 22,5$	56 ± 8
ПЛА–ДТ	$1,1 \pm 0,14$	$3,33 \pm 0,22$	$104 \pm 5,8$	135 ± 32
ПЛА–ДТ–ПАВ	$0,05 \pm 0,004$	$0,26 \pm 0,068$	$14 \pm 3,6$	25 ± 10
ПЛА–ДТ–ГН-10%	$0,43 \pm 0,17$	$1 \pm 0,23$	29 ± 18	$26 \pm 3,7$
ПЛА–ДТ–ГН-10%–ПАВ	$2,35 \pm 0,8$	4 ± 1	180 ± 17	$34 \pm 8,5$
ПЛА–ДТ–ГН-20%	$0,06 \pm 0,014$	$0,39 \pm 0,014$	$9,23 \pm 6,2$	$46 \pm 5,3$
ПЛА–ДТ–ГН-20%–ПАВ	$0,17 \pm 0,017$	$0,63 \pm 0,084$	$35,54 \pm 2$	$22,66 \pm 5,4$

Таким образом, механические свойства электроформованных ПЛА-матриц существенно зависят от совокупного влияния системы растворителей, ПАВ и содержания гиалуроната натрия. Наиболее выраженное повышение прочности и жесткости при введении ПАВ наблюдалось для состава с 10 об.% гиалуроната натрия, тогда как увеличение содержания ГН до 20 об.% сопровождалось общим снижением механических характеристик. Полученные результаты демонстрируют возможность направленного изменения механического поведения

многокомпонентных ПЛА-матрикс за счет состава формуемой системы. Оценка пригодности конкретных составов для биомедицинского применения должна проводиться с учетом не только механических характеристик, но также их деградиационного поведения и биологического ответа.

3.5 Формирование ориентированных ПЛА-матрикс с использованием параллельных электродов и постоянных магнитов

Для получения ориентированных (направленных) волокнистых матрикс из ПЛА–ГФИП были использованы два альтернативных метода модификации коллектора при электроформовании: система параллельных заземленных электродов (лезвий) и система постоянных магнитов, создающая направленное магнитное поле в зоне осаждения волокна. Степень ориентации полученных волокон оценивали методом количественного анализа СЭМ-микрофотографий с использованием программного модуля OrientationJ, позволяющего построить карты локальной ориентации волокон с цветовой кодировкой угла и соответствующие гистограммы углового распределения.

СЭМ-микрофотографии обоих образцов (рисунок 38, А и Б) демонстрируют выраженную анизотропию структуры матрикса: волокна преимущественно ориентированы вдоль одного направления, в отличие от хаотичной сетчатой структуры, характерной для стандартных нетканых матрикс, полученных на плоском заземленном коллекторе (см. раздел 3.1). На картах локальной ориентации (А', Б'), построенных в программе OrientationJ, преобладающая часть волокон закодирована оттенками зеленого цвета, соответствующими углу, близкому к 0° , что визуально подтверждает высокую степень выравнивания волокон в обоих образцах. Единичные волокна, ориентированные под углами, близкими к $\pm 90^\circ$ (закодированные красным и синим на карте), присутствуют в обоих образцах.

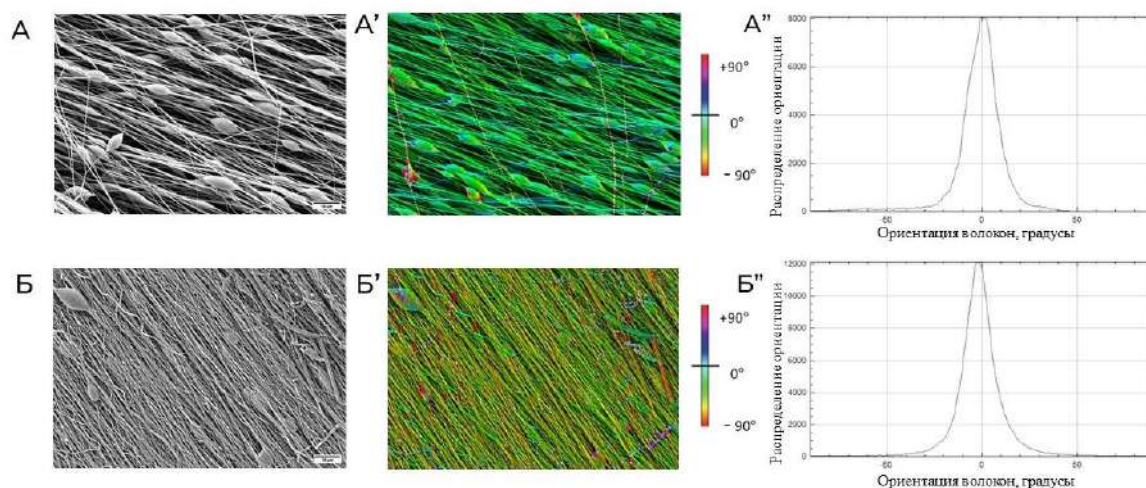


Рисунок 38 – Анализ ориентации ПЛА-волокон по СЭМ-микрофотографиям с использованием OrientationJ: (А) матрикс, полученный на параллельных заземленных электродах; (Б) матрикс, полученный с использованием постоянных магнитов; (А', Б') карты локальной ориентации; (А'', Б'') угловые распределения ориентации волокон.

Анализ OrientationJ показал выраженную преимущественную ориентацию волокон для обоих типов коллекторов. Коэффициент когерентности составил 0,70 для системы параллельных электродов и 0,76 для магнитного коллектора, что указывает на близкую высокую степень анизотропии обоих матриксов и несколько более узкое распределение ориентаций в случае магнитного коллектора.

Количественная оценка степени ориентации, выраженная коэффициентом когерентности (таблица 3), подтверждает результаты ориентационного анализа: для матрикса ПЛА–ГФИП, полученного на лезвиях, коэффициент когерентности составил 0,70, тогда как для матрикса, полученного с использованием магнитов, – 0,76. Поскольку коэффициент когерентности принимает значения от 0 (изотропная структура) до 1 (анизотропная структура), оба метода обеспечивают высокую степень анизотропии матрикса.

Таблица 3 Значение характеристики материалов с направленными волокнами, полученных альтернативными методами

Материалы	Когерентность
ПЛА–ГФИП–лезвия	0,70

ПЛА–ГФИП–магниты	0,76
------------------	------

Полученные результаты обосновывают целесообразность применения обоих методов для формирования ориентированных ПЛА-матрицков, предназначенных для имитации анизотропных тканевых структур (например, для матрицков для регенерации нервной ткани или мышечных волокон). Однако, стоит учитывать, что производительность данных методов невысокая в сравнении с постформовочной вытяжкой материалов в этиловом спирте (см. раздел 3.6).

Оба подхода позволяют формировать выраженно анизотропные волокнистые матриксы непосредственно на стадии электроформования. Вместе с тем площадь ориентированного материала определяется геометрией соответствующего коллектора, тогда как постформовочная вытяжка, рассмотренная в разделе 3.6, позволяет ориентировать уже сформированные нетканые матриксы.

3.6 Морфология направленных волокон, полученных вытяжкой в этаноле

В качестве контрольных образцов использовались матриксы ПЛА–ГФИП и ПЛА–ДТ с хаотично направленными волокнами рисунок 39. Результаты сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показали, что исходные матриксы были изотропными, однако морфология их волокон значительно различалась. Матриксы ПЛА–ГФИП состояли преимущественно из гладких волокон со средним диаметром 1500 ± 200 нм, тогда как матриксы ПЛА–ДТ – из пористых волокон со средним диаметром 1800 ± 800 нм. Такая зависимость морфологии от растворителя согласуется с предыдущими наблюдениями [247], согласно которым температура кипения растворителя, скорость испарения, вязкость, проводимость, поверхностное натяжение и переплетение полимерных цепей определяют стабильность электроформования, диаметр волокон и образование пористой поверхности.

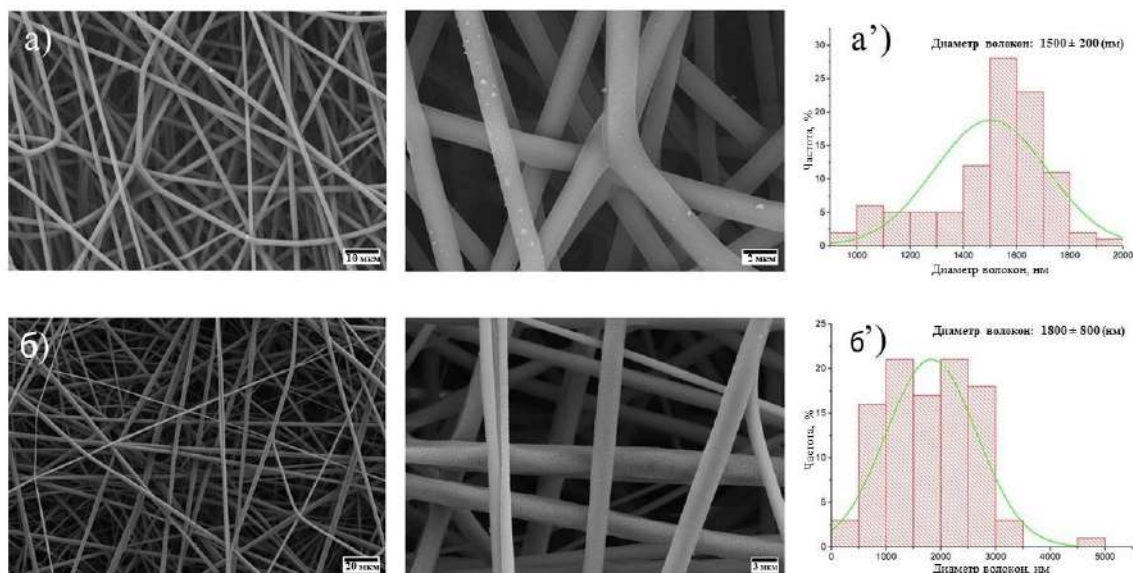


Рисунок 39 – СЭМ-микрофотографии ПЛА-матриц с хаотичной организацией волокон, изготовленных методом электроформования с использованием различных растворителей: (а) ГФИП; (б) ДТ. (а', б') – средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)

Анализ методом OrientationJ матриц ПЛА–ГФИП и ПЛА–ДТ (рисунок 40) выявил широкое угловое распределение и отсутствие выраженной преференциальной ориентации волокон, что согласуется со случайным, изотропным расположением волокон в свежеизготовленных методом электроформования матрицах.

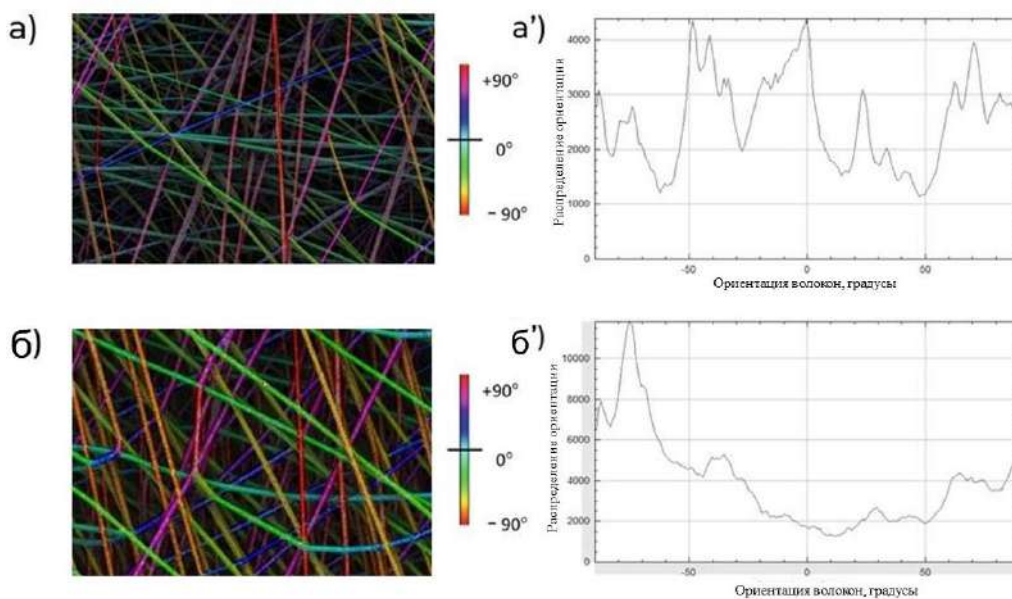


Рисунок 40 – Анализ OrientationJ микрофотографий СЭМ, матриксы на основе ПЛА, полученных методом электроформования с использованием различных растворителей: (а) хаотичные волокна, полученные с использованием ГФИП; (б) хаотичные волокна, полученные с использованием ДТ. Карты с цветовой кодировкой показывают локальную ориентацию волокон, определенную с помощью анализа OrientationJ. (а', б') – графики углового распределения ориентации волокон, соответствующие изображениям СЭМ, представленным на панелях (а–б)

Для изучения влияния механического растяжения на ориентацию волокон свежеизготовленные матриксы ПЛА–ДТ подвергали одноосному растяжению в этаноле до 100 %, 200 % и 300 % от их исходных размеров (рисунок 41). Основное уменьшение среднего диаметра наблюдалось при переходе от 100 к 200 % удлинения. При дальнейшем увеличении удлинения средний диаметр в пределах представленной точности не изменялся, тогда как распределение становилось более узким (рисунок 41 а–в): 1700 ± 750 нм, 400 ± 200 нм и 400 ± 100 нм при 100 %, 200 % и 300 % соответственно. Примечательно, что поверхностные поры, видимые на свежеизготовленных электроформованных волокнах ПЛА–ДТ, становились все менее заметными с увеличением коэффициента растяжения и переставали обнаруживаться при удлинении 300 % (рисунок 41 в). Отсутствие видимых структурных дефектов на волокнах на данном этапе указывает на то, что материал сохранил свою целостность на протяжении всей деформации.

ЭДС-анализ не выявил хлор выше предела обнаружения метода ($<0,1$ мас.%), что свидетельствует об отсутствии детектируемого остаточного ДХМ. При этом данный метод не позволяет оценивать возможное содержание остаточного ТГФ. Поэтому различие в деформационном поведении свежих и предварительно высушенных образцов может быть связано как с различием их физического состояния и термической истории, так и с присутствием компонентов, не определяемых данным ЭДС-анализом.

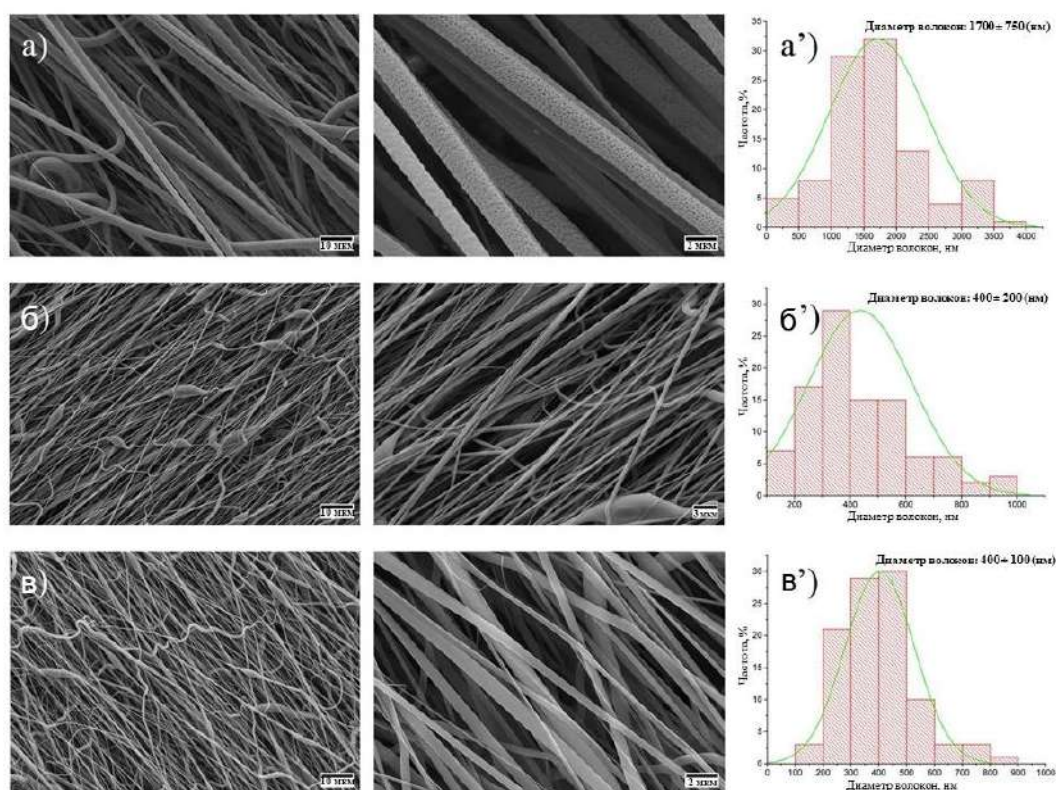


Рисунок 41 – Микрофотографии - СЭМ, волокнистых матриц ПЛА–ДТ, полученных в различных условиях: (а) при удлинении 100 %, (б) при удлинении 200 % и (в) при удлинении 300 %. (а', б', в') –средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)

Изображения, полученные методом, СЭМ для растянутых образцов серии ПЛА–ДТ (рисунок 42 а–в), проанализированные с помощью программы OrientationJ, показали, что все полученные матрицы характеризовались преимущественно ориентированным расположением волокон. Однако профили углового распределения различались между образцами. Образцы ПЛА–ДТ–200 и ПЛА–ДТ–300 демонстрировали более узкие и выраженные пики ориентации, что свидетельствует о более высокой степени выравнивания волокон. Следует отметить, что степень выравнивания не была строго монотонной на всех уровнях деформации. Немонотонность может отражать неоднородность перестройки волокон в материале при деформации либо межобразцовую вариабельность.

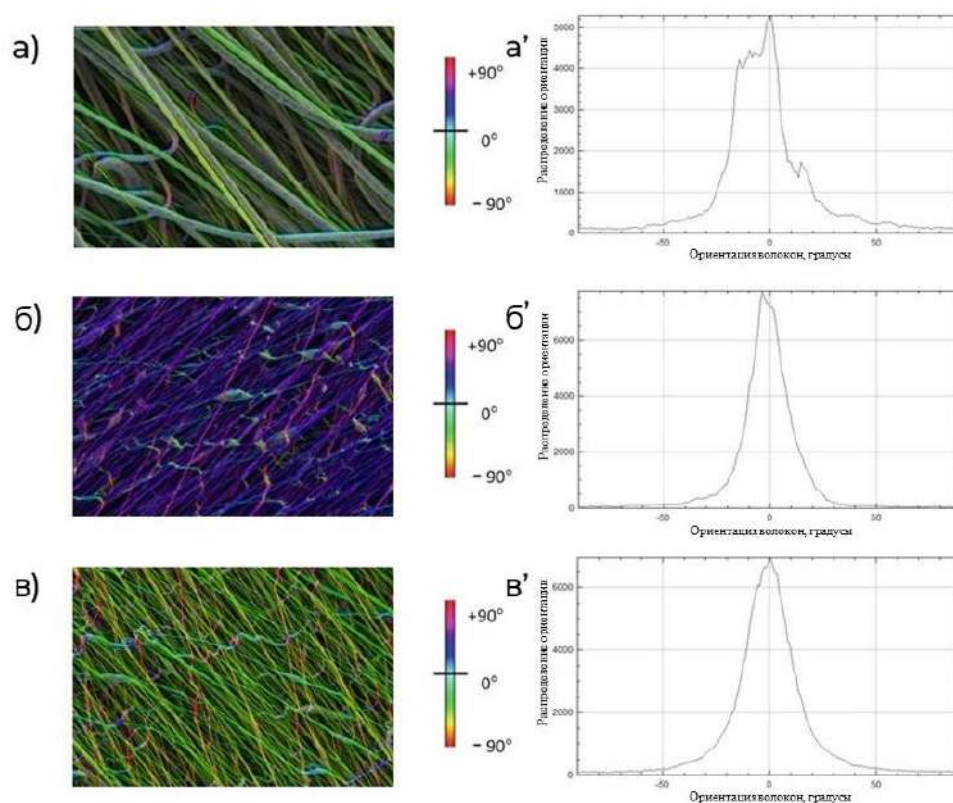


Рисунок 42 – Анализ ориентации с помощью программы OrientationJ микрофотографий – СЭМ волокнистых матриц, изготовленных в различных условиях: (а) растяжение на 100 %, (б) растяжение на 200 % и (в) растяжение на 300 %. Карты с цветовой кодировкой показывают локальную ориентацию волокон, определенную с помощью программы OrientationJ. (а', б', в') графики углового распределения ориентации волокон, соответствующие изображениям, полученным с помощью сканирующего электронного микроскопа, представленным на панелях (а–в)

Чтобы определить роль остаточного растворителя в поведении при деформации, матрицы ПЛА–ДТ–высушенные перед растяжением подвергали вакуумной сушке при 37 °С (рисунок 43). Учитывая, что ДХМ, который не был детектирован ЭДС, основной компонент смеси растворителей (80 %), обладает относительно низкой температурой кипения (39,7 °С), ожидалось эффективное удаление остаточного растворителя в условиях вакуума. При растяжении высушенные волокна ПЛА–ДТ демонстрировали локальные структурные дефекты и неравномерное уменьшение диаметра, в отличие от однородной деформации, наблюдаемой в свежеизготовленных матрицах. Эти различия могут быть связаны с изменением физического состояния аморфной фазы после вакуумной сушки и уменьшением пластифицирующего влияния остаточного растворителя. Количественный анализ выявил менее выраженное уменьшение диаметра волокон по сравнению со свежими образцами: с 1800 ± 800 нм при удлинении 100 % до 1100 ± 600 нм при удлинении 300 % (рисунок 43 а'–в'), с образованием локальных зон истончения вдоль отдельных волокон

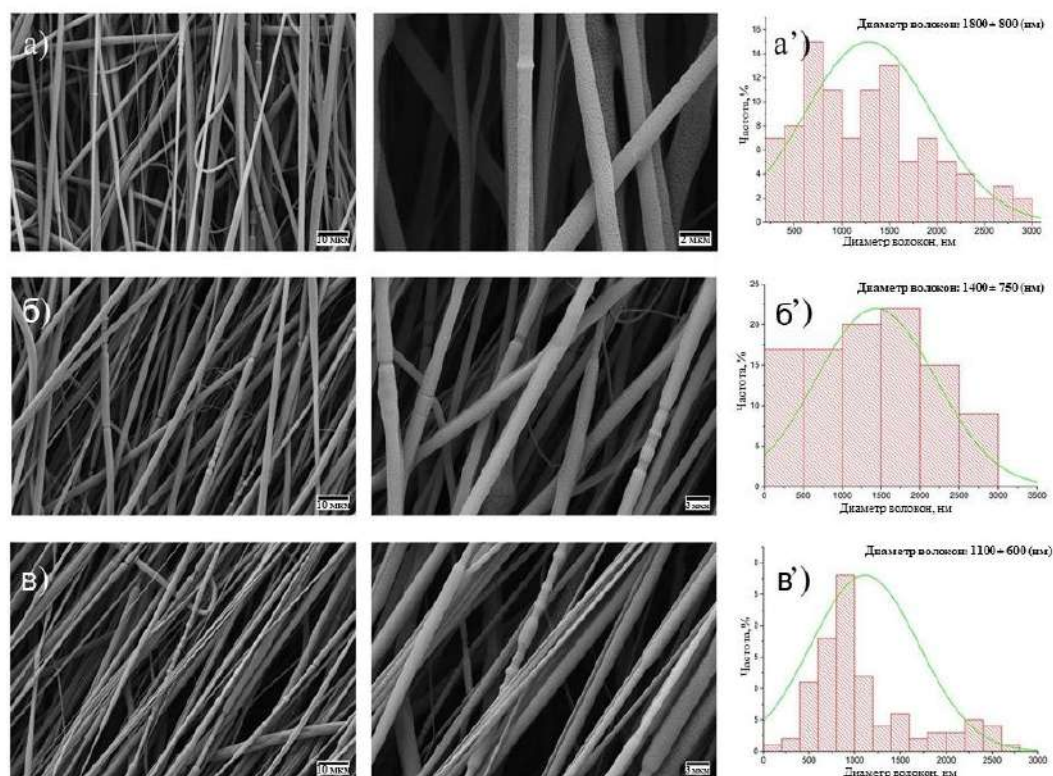


Рисунок 43 – Микрофотографии – СЭМ волокнистых матриц, материала ПЛА–ДТ–высушенные, изготовленных: (а) при удлинении 100 %, (б) при удлинении 200 %, (в) при удлинении 300 %. (а', б', в') –средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)

Анализ OrientationJ предварительно высушенных матриц ПЛА–ДТ–высушенные (рисунок 44) продемонстрировал постепенное упорядочение волокон с увеличением коэффициента растяжения. Образец, высушенный на 100 % (рисунок 44 а, а'), демонстрировал широкое угловое распределение, свидетельствующее о низкой степени выравнивания, которое постепенно сужалось при 200 % (рисунок 44 б, б'), где в области положительных углов появлялся асимметричный пик, отражающий частичную переориентацию волокон вдоль оси деформации. Наиболее узкое и интенсивное распределение наблюдалось при 300 % (рисунок 44 в, в'). Таким образом, вакуумная сушка не подавляет переориентацию волокон, вызванную растяжением, хотя, как отмечалось выше, этот процесс сопровождается локальными дефектами волокон и менее равномерным уменьшением диаметра по сравнению со свежизготовленными матрицами

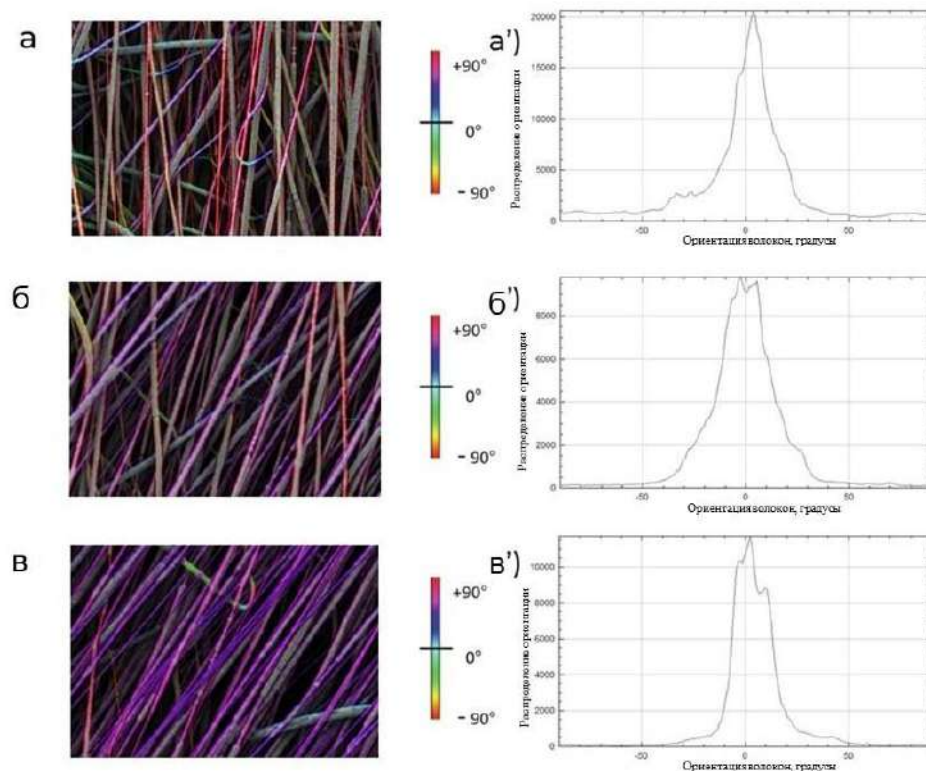


Рисунок 44 – Анализ OrientationJ микрофотографий-СЭМ, волокнистых матриц, образцов ПЛА–ДТ–высушенные, изготовленных: (а) при удлинении 100 %, (б) при удлинении 200 %, (в) при удлинении 300 %. Карты с цветовой кодировкой показывают локальную ориентацию волокон, определенную с помощью анализа OrientationJ. (а'–в') Графики углового распределения ориентации волокон, соответствующие изображениям, СЭМ, представленным на панелях (а–в)

Результаты анализа распределения ориентации волокон для серии ПЛА–ДТ приведены в таблице 4. Образцы ПЛА–ДТ–300 и ПЛА–ДТ–300–высушенные продемонстрировали самые узкие пики, что подтверждается степенью когерентности, равной 0,69 и 0,68 соответственно.

Таблица 4. Параметры распределения ориентации волокон в серии матриц ПЛА–ДТ.

Материалы	Когерентность
ПЛА–ДТ–100	0,4
ПЛА–ДТ–200	0,68

ПЛА–ДТ–300	0,69
ПЛА–ДТ–100–высушенные	0,4
ПЛА–ДТ–200–высушенные	0,45
ПЛА–ДТ–300–высушенные	0,68

В свежеизготовленных матриксах ПЛА–ГФИП содержалось $3,27 \pm 0,15$ мас. % фтора, что было определено с помощью ЭДС–анализа (рисунок А.1). Поскольку единственным источником фтора в исследуемой системе являлся ГФИП, наличие F использовали как маркер остаточного фторсодержащего растворителя. Это согласуется с температурой кипения ГФИП (59 °С) и его частичным удержанием в структуре волокон после электроформования (рисунок 45 а–в). При растяжении с использованием этанола в образцах ПЛА–ГФИП наблюдалось выраженное выравнивание волокон и небольшое снижение среднего диаметра волокон: от 1200 ± 200 нм при удлинении 100 % до 850 ± 130 нм при удлинении 300 % (рисунок 45 а’–в’). Наблюдаемое отсутствие выраженных структурных дефектов может быть связано с пластифицирующим действием остаточного растворителя и этанола, повышающим подвижность аморфной фазы ПЛА.

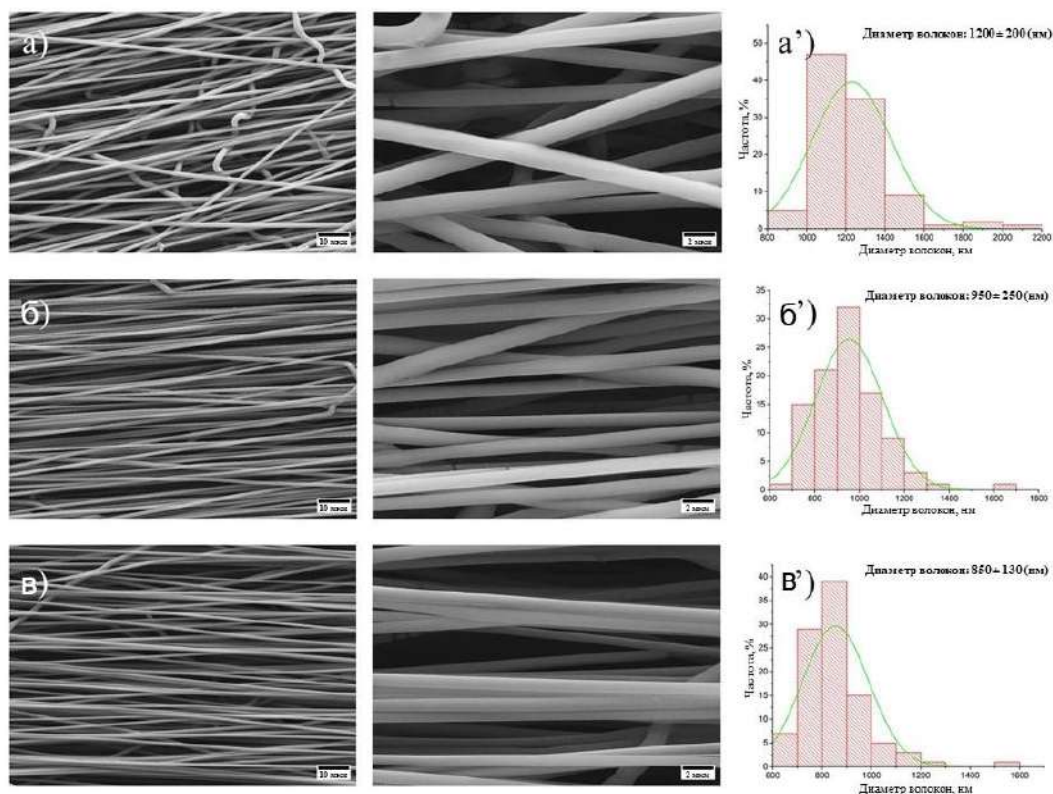


Рисунок 45 – Микрофотографии-СЭМ ПЛА–ГФИП, волокнистых матриц, изготовленных: (а) при удлинении 100 %, (б) при удлинении 200 %, (в) при удлинении 300 %. (а', б', в') – средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)

Анализ ориентации образцов ПЛА–ГФИП (рисунок 46) подтвердил эффективное выравнивание волокон при растяжении. Уже при удлинении 100 % (рисунок 46 а) угловое распределение демонстрировало отчетливый максимум, указывающий на начало преимущественной ориентации волокон. Дальнейшее увеличение деформации до 200 % (рисунок 46 б) привело к сужению распределения, что соответствует повышению анизотропии в материале, тогда как при удлинении 300 % (рисунок 46 в) профиль ориентации оставался резко локализованным.

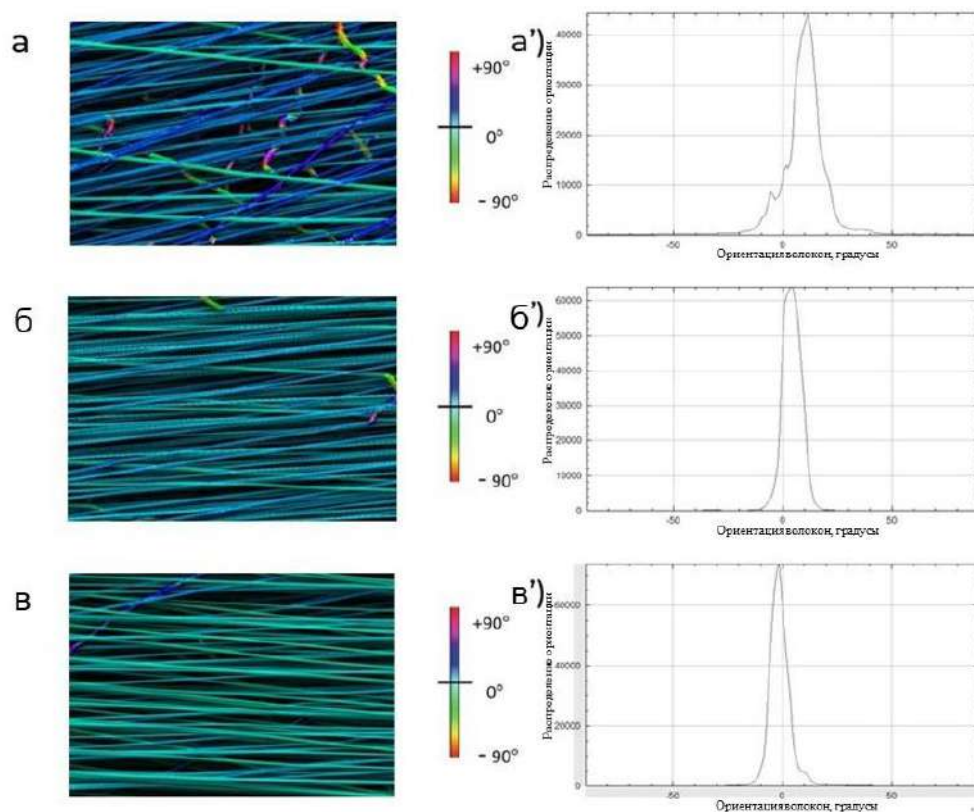


Рисунок 46 – Анализ OrientationJ микрофотографий-СЭМ, для ПЛА–ГФИП волокнистых матриц, изготовленных: (а) при удлинении 100 %, (б) при удлинении 200 %, (в) при удлинении 300 %. Карты с цветовой кодировкой показывают локальную ориентацию волокон, определенную с помощью анализа OrientationJ. (а'–в') Графики углового распределения ориентации волокон, соответствующие изображениям, СЭМ, представленным на панелях (а–в)

После вакуумной сушки при 37 °С остаточное содержание фтора в матрицах ПЛА–ГФИП–высушенные снизилось до $0,99 \pm 0,15$ мас. %, но не было полностью удалено (рисунок А.2), что согласуется с данными литературы. При растяжении в среде этанола высушенные образцы сохраняли способность к выравниванию волокон с увеличением степени растяжения, что сопровождалось постепенным уменьшением среднего диаметра волокон с 1000 ± 150 нм при 100 % до 850 ± 150 нм при 300 % удлинения (рисунок 47 а'–в'). Наблюдались локальное истончение волокон и незначительные структурные дефекты; однако они были менее выраженными, чем те, что были обнаружены в серии высушенных образцов ДТ, что, вероятно, отражает частичный пластифицирующий эффект оставшегося остаточного ГФИП.

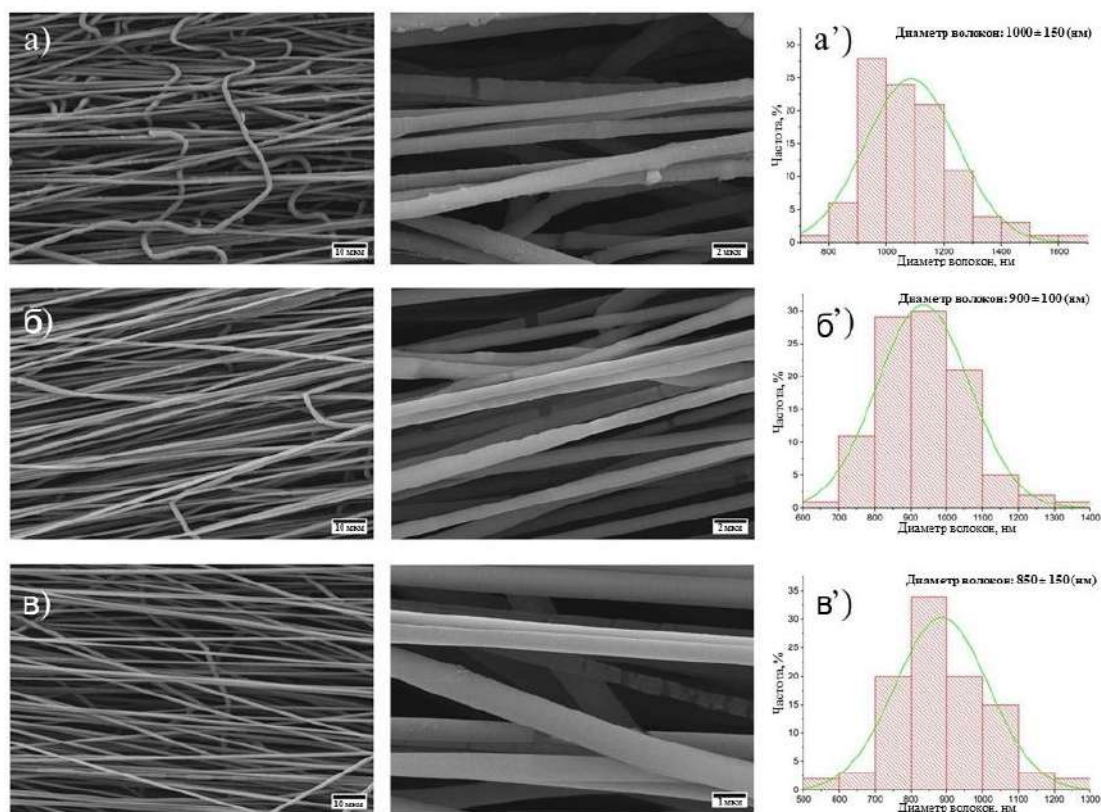


Рисунок 47 – СЭМ-микрофотографии образцов волокнистых матриц, ПЛА–ГФИП–высушенные, изготовленных: (а) при удлинении 100 %, (б) при удлинении 200 %, (в) при удлинении 300 %. (а', б', в') –средние диаметры волокон (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)

Анализ ориентации волокон в высушенных образцах ПЛА–ГФИП (рисунок 48) подтвердил, что упорядоченность волокон сохранялась и усиливалась с увеличением коэффициента растяжения. При удлинении 100 % (рисунок 48 а) угловое распределение оставалось относительно широким, что свидетельствовало лишь о частичной ориентации. При 200 % (рисунок 48 б) сформировался выраженный узкий пик, а при 300 % (рисунок 48 в) распределение стало еще более локализованным, что соответствует высокому одноосному выравниванию вдоль направления растяжения. Несмотря на наличие локальных участков истончения и незначительных дефектов, вызванных вакуумной сушкой, общая архитектура волокон сохранилась, в то время как увеличение деформации привело к уменьшению среднего диаметра волокон и снижению его дисперсии. Эти результаты указывают на то, что остаточное содержание ГФИП не препятствует эффективной переориентации волокнистой сети ПЛА–ГФИП.

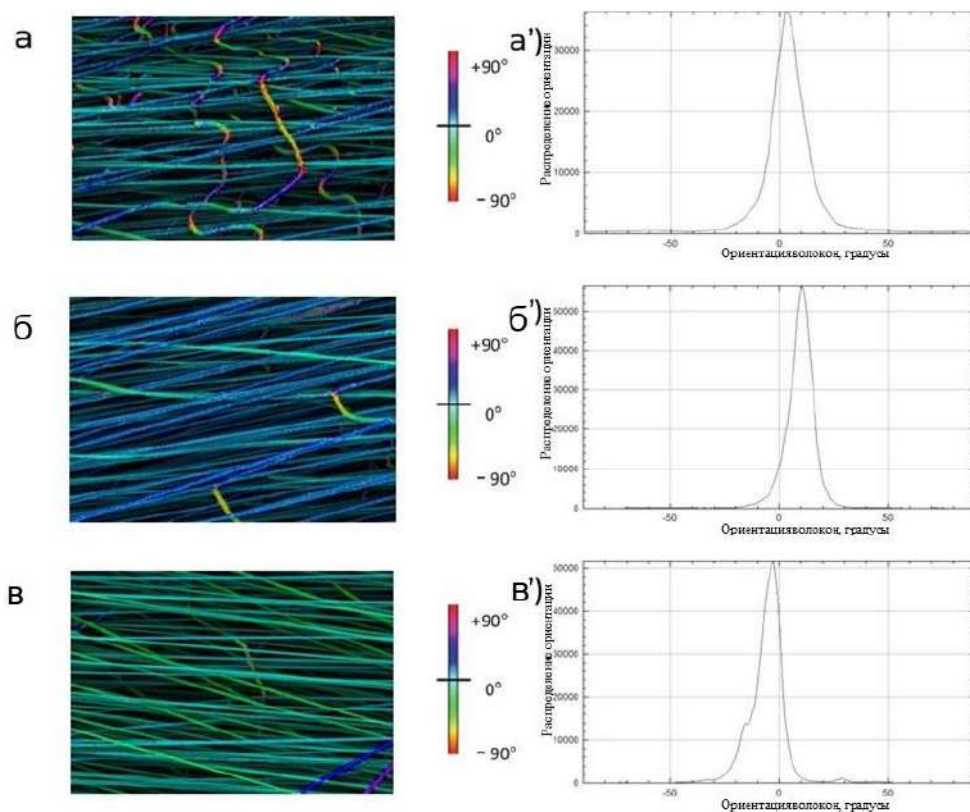


Рисунок 48 – Анализ микрофотографий-СЭМ волокнистых матриц, с использованием программы OrientationJ для образцов ПЛА–ГФИП–высушенные: (а) при удлинении 100 %, (б) при удлинении 200 %, (в) при удлинении 300 %. Карты с цветовой кодировкой показывают локальную ориентацию волокон, определенную с помощью анализа OrientationJ. (а'–в'). Графики углового распределения ориентации волокон, соответствующие изображениям СЭМ, представленным на панелях (а–в)

Параметры распределения ориентации волокон для серий ПЛА–ГФИП и ПЛА–ГФИП–высушенные приведены в таблице 5.

Таблица 5. Параметры распределения ориентации волокон в серии матриц ПЛА–ГФИП.

Материалы	Когерентность
ПЛА–ГФИП–100	0,76
ПЛА–ГФИП–200	0,83

ПЛА–ГФИП–300	0,86
ПЛА–ГФИП–100–высушенные	0,6
ПЛА–ГФИП–200–высушенные	0,72
ПЛА–ГФИП–300–высушенные	0,79

Анализ морфологии волокон СЭМ показал, что остаточный растворитель оказывает заметное влияние на качество волокон во время растяжения после электроформования. Однако дополнительная вакуумная сушка для удаления ГФИП не требуется, поскольку ГФИП экстрагируется в этанол в процессе растяжения. Этот вывод подтверждается результатами ЭДС–измерений, в ходе которых в растянутых образцах не было обнаружено фтора (используемого в качестве маркера ГФИП) в концентрации, превышающей предел обнаружения прибора, равный 0,1 % по массе (рисунок А.3).

Таблица 6. Объединенные морфологические параметры

Тип материала	Мас.% хлора	Начальный диаметр (нм)	Средний диаметр при вытяжке на 100 % (нм)	Средний диаметр при вытяжке на 200 % (нм)	Средний диаметр при вытяжке на 300 % (нм)	Видимые дефекты
ПЛА–ДТ	<0,1	1800 ± 800	1700±750	400±200	400±100	Нет
ПЛА–ДТ–	<0,1	1800 ± 800	1800±800	1400±800	1100±600	Значительные

высушенн ые						
Тип материала	Мас.% фтора	Начальны й диаметр (нм)	Средний диаметр при вытяжке на 100 % (нм)	Средний диаметр при вытяжке на 200 % (нм)	Средний диаметр при вытяжке на 300 % (нм)	Видимые дефекты
ПЛА– ГФИП	3,27±0,15	1500 ± 200	1200±200	950±250	850±130	Нет
ПЛА– ГФИП– высушенн ые	0,99±0,15	1500 ± 200	1000±150	900±100	850±150	Незначительн ые

3.7 Механические свойства ориентированных матриц

Механические свойства матриц ПЛА–ДТ и ПЛА–ГФИП зависели от системы растворителей, морфологии волокон, предварительной сушки и степени постформовочной вытяжки. Для матриц ПЛА–ДТ, характеристики при растяжении представлены на рисунке 49 и обобщены в таблице 7. Для свежеелектроформованных ПЛА–ДТ максимальная прочность наблюдалась после вытяжки на 100 %, после чего при 200 и 300 % она снижалась одновременно с уменьшением модуля Юнга. Для предварительно высушенных образцов модуль также снижался при увеличении степени вытяжки, однако изменение предела прочности было немонотонным: после некоторого снижения при 200 % максимальное среднее значение было получено при 300 %. Высокий разброс значений указывает на значительную неоднородность механического поведения этой серии.

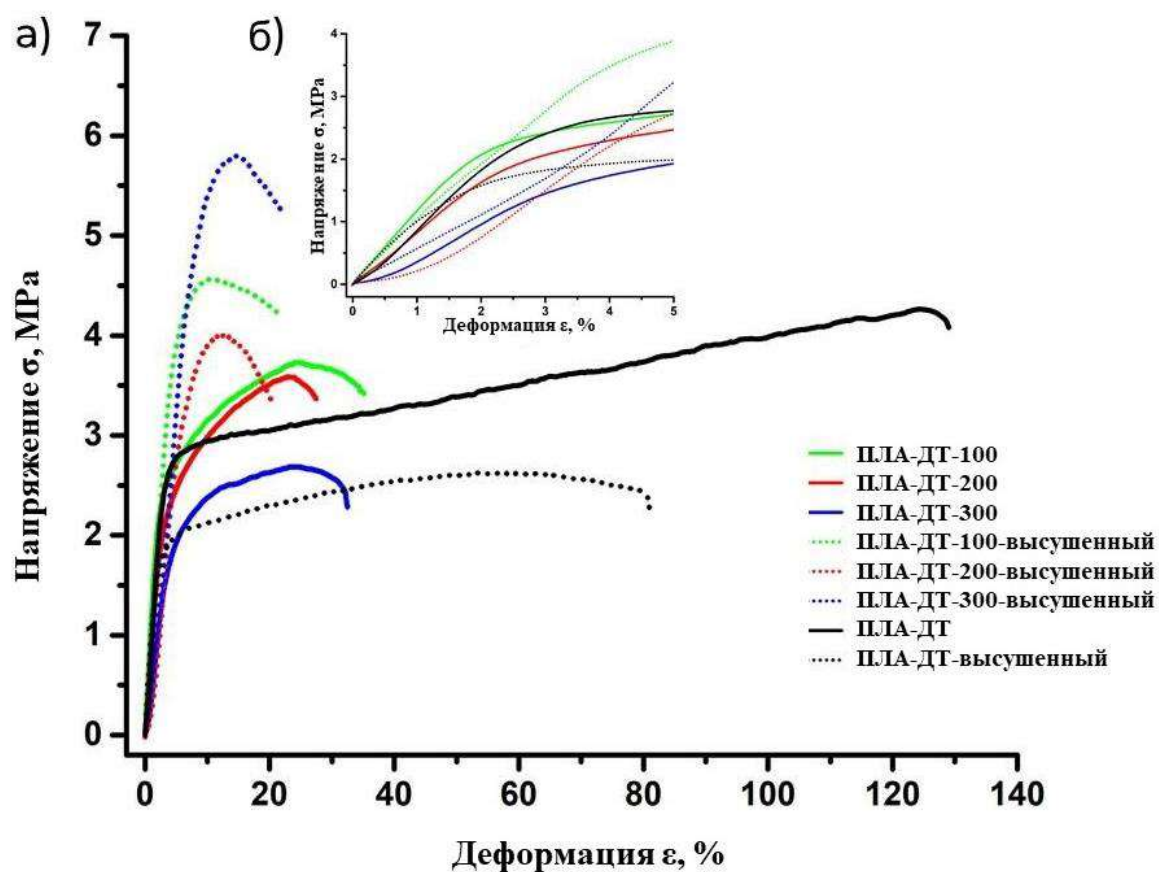


Рисунок 49 – Кривые «напряжение–деформация» ПЛА–ДТ (а) и увеличенный фрагмент начального линейного участка (б).

Таблица 7. Сводные данные о механических свойствах ПЛА–ДТ

Материал	Условный предел упругости, МПа	Предел прочности при растяжении, МПа	Модуль Юнга, МПа	Относительное удлинение при разрыве (ϵ), %
ПЛА–ДТ–100	$1,6 \pm 0,8$	$4,6 \pm 0,9$	122 ± 50	35 ± 12
ПЛА–ДТ–200	$1,54 \pm 0,7$	$3,59 \pm 1,59$	$86,3 \pm 54,7$	$23,6 \pm 0,9$
ПЛА–ДТ–300	$1,28 \pm 1$	$2,71 \pm 1,76$	$47,8 \pm 39$	26 ± 4

ПЛА–ДТ– 100– высушенны е	$3,20 \pm 0,55$	$4,56 \pm 0,7$	128 ± 65	$12 \pm 3,5$
ПЛА–ДТ– 200– высушенны е	$2,4 \pm 1,2$	$4,0 \pm 2,2$	$53,6 \pm 39$	$14 \pm 2,9$
ПЛА–ДТ– 300– высушенны е	$3,66 \pm 1,73$	$6,0 \pm 2,5$	50 ± 37	$17 \pm 5,6$
ПЛА–ДТ	$1,50 \pm 0,66$	$2,56 \pm 0,68$	120 ± 17	129 ± 50
ПЛА–ДТ– высушенны е	$1,7 \pm 0,68$	$2,63 \pm 0,7$	103 ± 27	89 ± 47

Для экспериментов по постформовочной вытяжке использовали отдельную серию матриц; поэтому исходные механические характеристики этой серии несколько отличаются от значений, приведенных в разделе 3.4.

На рисунке 50 и в таблице 8 приведены механические свойства матриц ПЛА-ГФИП. При использовании ГФИП в качестве растворителя наблюдается заметная разница в модуле Юнга между образцами, прошедшими сушку, и образцами, в которых остался остаточный растворитель. Для образцов, не подвергавшихся растяжению, вакуумная сушка приводит к увеличению модуля Юнга с 80 ± 11 МПа до 170 ± 70 . В то же время для высушенных и растянутых образцов наблюдается иная картина: модуль Юнга снижается с 330 ± 50 МПа до 43 ± 13 МПа при удлинении 100 % и 300 % соответственно; это может быть связано с дефектами, появившимися в волокнах после растяжения. Напротив, для образцов, растянутых до 300 % от исходной длины без предварительной сушки, эта зависимость обратная: свежеелектроформованный образец ПЛА-ГФИП-300 демонстрирует более высокий модуль, чем ПЛА-ГФИП-300-высушенные.

Таким образом, значения модуля Юнга для свеженапыленных образцов колеблются от 400 ± 20 до 420 ± 60 МПа при удлинении 100 % и 300 % соответственно. В пределах экспериментальной погрешности модуль Юнга свежих матриксов ПЛА–ГФИП не претерпел заметных изменений в диапазоне растяжения 100–300 %.

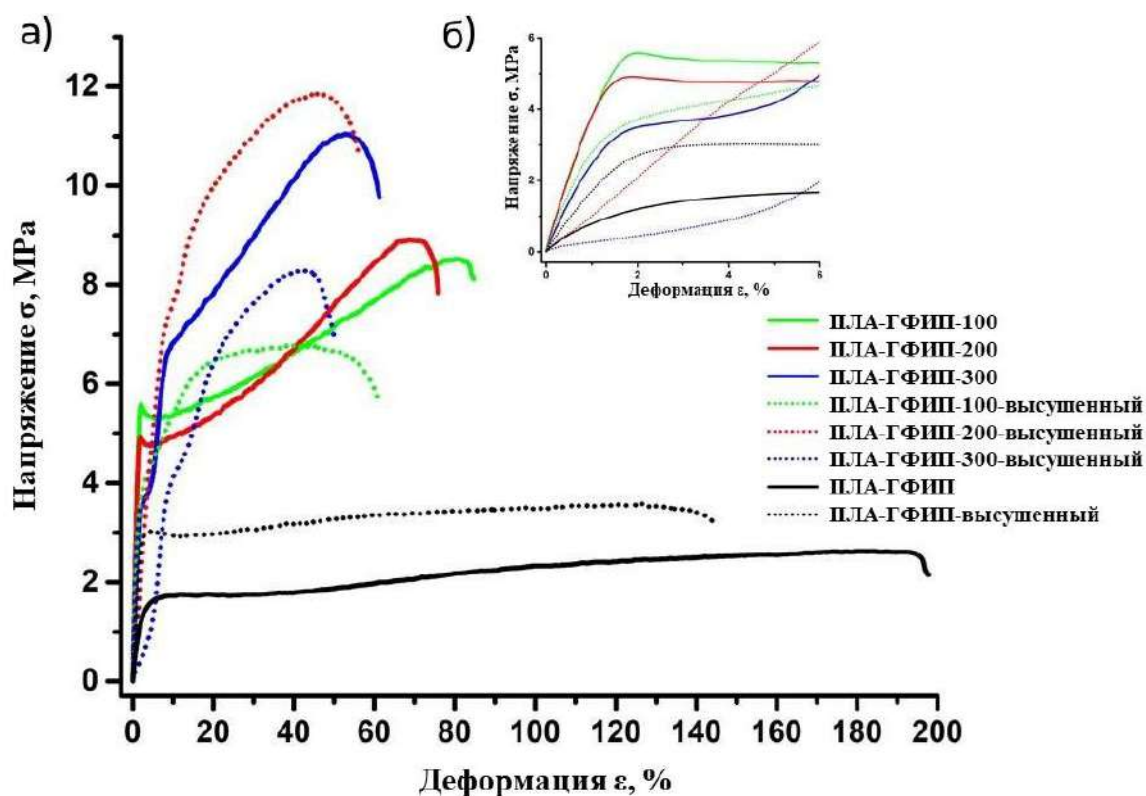


Рисунок 50 – Кривые «напряжение–деформация» ПЛА–ГФИП (а) и увеличенный фрагмент начального линейного участка (б).

Таблица 8. Сводные данные по механическим свойствам ПЛА–ГФИП

Материал	Условный предел упругости, МПа	Предел прочности при растяжении, МПа	Модуль Юнга, МПа	Относительное удлинение при разрыве (ϵ), %
ПЛА–ГФИП–100	$4,7 \pm 0,3$	$9,5 \pm 1$	400 ± 20	80 ± 20
ПЛА–ГФИП–200	$3 \pm 0,1$	9 ± 1	390 ± 30	70 ± 8

ПЛА– ГФИП–300	$5 \pm 2,7$	$11 \pm 0,8$	420 ± 60	50 ± 4
ПЛА– ГФИП–100– высушенны е	3 ± 1	$6,7 \pm 2$	330 ± 50	60 ± 17
ПЛА– ГФИП–200– высушенны е	$6,8 \pm 2,5$	$11,8 \pm 4$	150 ± 100	50 ± 13
ПЛА– ГФИП–300– высушенны е	$4 \pm 1,7$	$7 \pm 2,5$	43 ± 13	38 ± 14
ПЛА– ГФИП	$1,8 \pm 0,8$	$2,71 \pm 0,55$	80 ± 11	220 ± 30
ПЛА– ГФИП– высушенны е	$2,72 \pm 1$	$3,7 \pm 1,2$	170 ± 70	140 ± 50

В случае обеих систем растворителей вытяжка привела к значительному снижению удлинения при разрыве по сравнению с соответствующими неориентированными матриксами. Удлинение при разрыве свежего ПЛА–ДТ уменьшилось со 129 ± 50 % в невытянутом состоянии до 35 ± 12 %, 24 ± 1 % и 26 ± 4 % после вытяжки на 100, 200 и 300 % соответственно. Аналогичное снижение наблюдалось и для свежего ПЛА–ГФИП, у которого удлинение при разрыве уменьшилось с 220 ± 30 % до 80 ± 20 %, 70 ± 8 % и 50 ± 4 % после вытяжки на 100, 200 и 300 %, соответственно. Предварительная сушка еще больше снизила пластичность вытянутых матриксов, особенно в серии ПЛА–ДТ, где удлинение при разрыве составило всего 12 ± 4 %, 14 ± 3 % и 17 ± 6 % для образцов, вытянутых на 100, 200 и 300 %, соответственно.

В совокупности данные, приведенные в таблицах 7 и 8, показывают, что матриксы ПЛА–ГФИП при вытяжке с использованием этанола ведут себя значительно эффективнее, чем матриксы ПЛА–ДТ, причем свежий ПЛА–ГФИП сохраняет в несколько раз более высокую жесткость и прочность при всех коэффициентах вытяжки. Вакуумная сушка нивелирует это преимущество при высоких коэффициентах вытяжки, поскольку модуль упругости и прочность ПЛА–ГФИП–высушенные прогрессивно ухудшаются с увеличением деформации, тогда как предварительно высушенный ПЛА–ДТ демонстрирует сравнительно менее резкое снижение. Для обеих систем растворителей вытяжка резко снижает относительное удлинение при разрыве по сравнению с неориентированными матриксами, а предварительная сушка дополнительно уменьшает пластичность, что особенно заметно в серии ПЛА–ДТ.

Таким образом, постформовочная вытяжка свежих ПЛА–ГФИП-матриксов приводила к выраженному увеличению жесткости и прочности: модуль Юнга возрастал примерно в пять раз по сравнению с невытянутым материалом и оставался в диапазоне 390–420 МПа при вытяжке 100–300 %. Одновременно относительное удлинение при разрыве снижалось с 220 ± 30 до 50–80 %, что указывает на переход к более жесткому и менее деформируемому состоянию.

3.8 Дифференцирующая сканирующая калориметрия

Согласно данным ДСК, серия ПЛА-ДТ (рисунок 51) демонстрировала изменение температуры стеклования (T_g) в зависимости от степени вытяжки и состояния сушки (таблица 9). Для свежизготовленного матрикса ПЛА-ДТ, полученной методом электроформования, T_g составляла 57,60 °С; после вытяжки на 300 % T_g увеличилась до 61,50 °С. Для высушенных образцов T_g ПЛА-ДТ-высушенные составляла 59,66 °С и увеличилась до 62,12 °С после вытяжки ПЛА-ДТ-300-высушенные с коэффициентом 300 %.

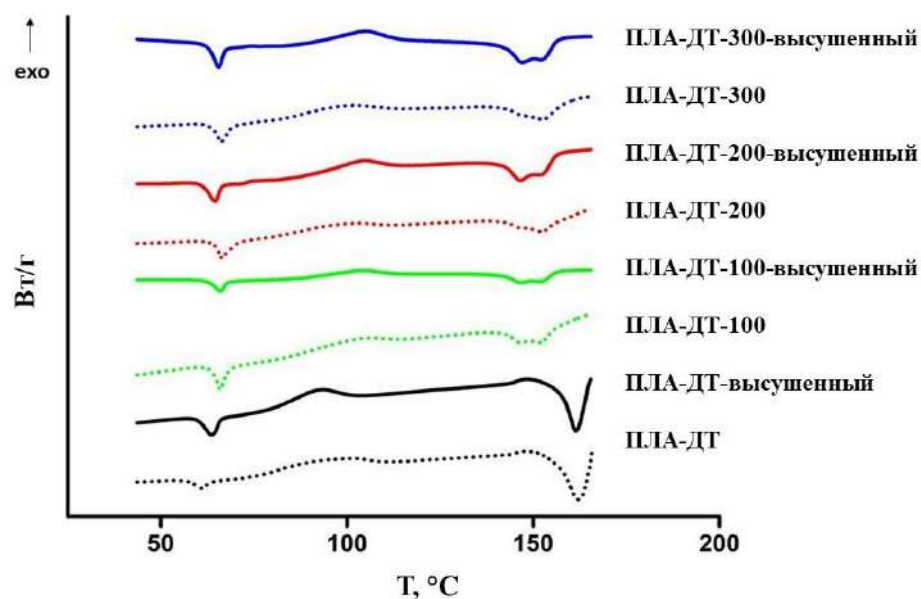


Рисунок 51 –Кривые ДСК для ПЛА-ДТ: высушенные образцы (ПЛА-ДТ-300-высушенные, ПЛА-ДТ-200-высушенные, ПЛА-ДТ-100-высушенные, ПЛА-ДТ-высушенные) и свежеизготовленные методом электроформования образцы (ПЛА-ДТ-300, ПЛА-ДТ-200, ПЛА-ДТ-100, ПЛА-ДТ).

Таблица 9. Температура стеклования образцов ПЛА–ДТ

Материал	Температура стеклования, °С
ПЛА–ДТ–100	62,81
ПЛА–ДТ–200	63,71
ПЛА–ДТ–300	61,50
ПЛА–ДТ–100– высушенные	62,29
ПЛА–ДТ–200– высушенные	60,71
ПЛА–ДТ–300– высушенные	62,12
ПЛА–ДТ	57,60
ПЛА–ДТ– высушенные	59,66

Как для серии ПЛА-ДТ, так и для серии ПЛА-ДТ-высушенные наблюдается сдвиг T_g между состояниями свежего электроформованного материала и высушенного материала, что свидетельствует об изменениях подвижности аморфной фазы и перераспределении состояния релаксации макромолекулярных цепей. Серия ПЛА-ГФИП (рисунок 52) также продемонстрировала сдвиги T_g в зависимости от степени вытяжки и термической истории (таблица 10). Для свежеелектроформованного матрикса ПЛА-ГФИП T_g составляла 46,04 °С и увеличивалась до 64,13 °С после вытяжки на 300 %. В серии высушенных образцов T_g для

ПЛА-ГФИП-высушенные составляла 59,53 °С, а для ПЛА-ГФИП-300-высушенные после вытяжки на 300 % –59,40 °С.

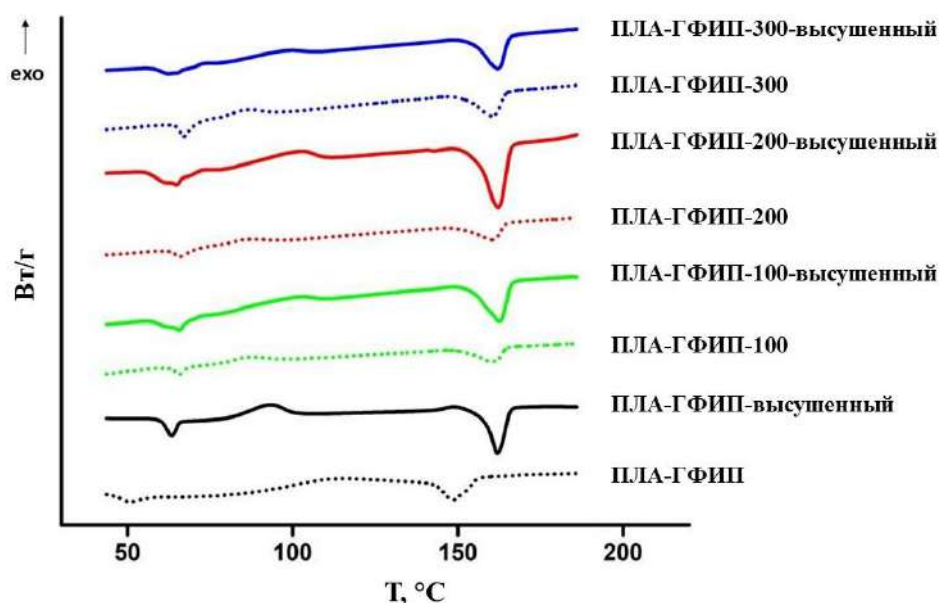


Рисунок 52 – Кривые ДСК для ПЛА-ГФИП: высушенные образцы (ПЛА-ГФИП-300-высушенные, ПЛА-ГФИП-200-высушенные, ПЛА-ГФИП-100-высушенные, ПЛА-ГФИП-высушенные) и свежеизготовленные методом электроформования образцы (ПЛА-ГФИП-300, ПЛА-ГФИП-200, ПЛА-ГФИП-100, ПЛА-ГФИП).

Таблица 10. Температура стеклования образцов ПЛА–ГФИП

Материал	Температура стеклования, °С
ПЛА–ГФИП–100	62,42
ПЛА–ГФИП–200	62,33
ПЛА–ГФИП–300	64,13
ПЛА–ГФИП–100–высушенные	58,95
ПЛА–ГФИП–200–высушенные	57,65
ПЛА–ГФИП–300–высушенные	59,40
ПЛА–ГФИП	46,04
ПЛА–ГФИП–высушенные	59,53

В серии ПЛА–ДТ значения T_g изменялись в относительно узком диапазоне, что согласуется с отсутствием выраженного пластифицирующего эффекта остаточного ДХМ. Наиболее существенное различие наблюдалось для свежего ПЛА–ГФИП, характеризующегося значительно пониженной T_g . Вакуумная сушка и последующая обработка в этаноле устраняли это снижение. Таким образом, ДСК- и ЭДС-данные взаимно дополняют друг друга и показывают, что физическое состояние аморфной фазы для материала ПЛА–ГФИП существенно определяется присутствием остаточного фторсодержащего растворителя.

3.9 Анализ структуры методом малоуглового и широкоуглового рентгеновского рассеяния

На рисунке 53 представлены двумерные картины рентгеновского рассеяния и соответствующие им азимутальные профили интенсивности. Азимутальные профили анализировали для аморфного ореола в диапазоне $q = 1,13 \pm 0,25 \text{ \AA}^{-1}$, при этом интенсивность рассеяния отображали в зависимости от азимутального угла в диапазоне $0-180^\circ$, где 0° определяли как направление, перпендикулярное оси вытяжки (правая сторона двумерной дифрактограммы). Азимутальные профили для серии ПЛА–ДТ представлены в четырех состояниях: сразу после электроформования (а'), после вытяжки на 300 % (б'), после сушки без предварительной вытяжки (в') и после сушки с последующей вытяжкой на 300 % (г'). Степень молекулярной ориентации в аморфной фазе оценивалась с помощью коэффициента ориентации Германа, приведенного в таблице 11.

Для свежеелектроформованного образца ПЛА–ДТ (рисунок 53, а') двумерная дифракционная картина (как МУРР, так и БУРР) демонстрирует практически осесимметричное распределение интенсивности без выраженной азимутальной анизотропии. Азимутальный профиль (рисунок 53, а''–г'') характеризуется равномерным распределением интенсивности с незначительными флуктуациями, что соответствует практически изотропному структурному состоянию. Это находит отражение в коэффициенте ориентации Германа, близком к нулю ($f = 0,002$, табл. 11), что подтверждает отсутствие какой-либо преференциальной ориентации структурных элементов.

После растяжения до 300 % (рисунок 53, б') образец ПЛА–ДТ-300 демонстрирует заметное изменение распределения интенсивности. Азимутальный профиль интенсивности приобретает отчетливую U-образную форму с минимумом при 90° и нарастающей интенсивностью в направлении периферийных углов 0° и 180° , что свидетельствует о формировании преимущественной молекулярной ориентации. Коэффициент ориентации Германа увеличивается до $f = 0,035$ (табл. 11), что является наибольшим значением в данной серии. Хотя абсолютное

значение остается низким и не указывает на высокоориентированное состояние, увеличение на порядок по сравнению со свежеизготовленным методом электроформования образцом свидетельствует о появлении слабой, но воспроизводимой азимутальной анизотропии по сравнению с исходным образцом.

Высушенный, нерастянутый образец ПЛА-ДТ-высушенные (рисунок 53, в') также демонстрирует практически изотропную картину рассеяния, без выраженных максимумов или минимумов в азимутальном профиле, за исключением случайного шума. Коэффициент ориентации Германа достигает своего минимального значения в данной серии, $f = 0,0009$ (таблица 11), что свидетельствует о том, что сама по себе сушка не вызывает ориентационного упорядочения в материале.

Для образца ПЛА-ДТ-300-высушенные (рисунок 53, г'), который сначала был вытянут, а затем высушен, двумерная дифракционная картина сохраняет признаки анизотропии, хотя они менее выражены, чем в образце, подвергшемся только вытяжке. Азимутальный профиль остается U-образным, но разница между минимальной и максимальной интенсивностью меньше, чем на рисунок 53, б'. Коэффициент ориентации Германа составляет $f = 0,015$ (таблица 11), что выше, чем для обоих нерастянутых образцов, но заметно ниже, чем для ПЛА-ДТ-300.

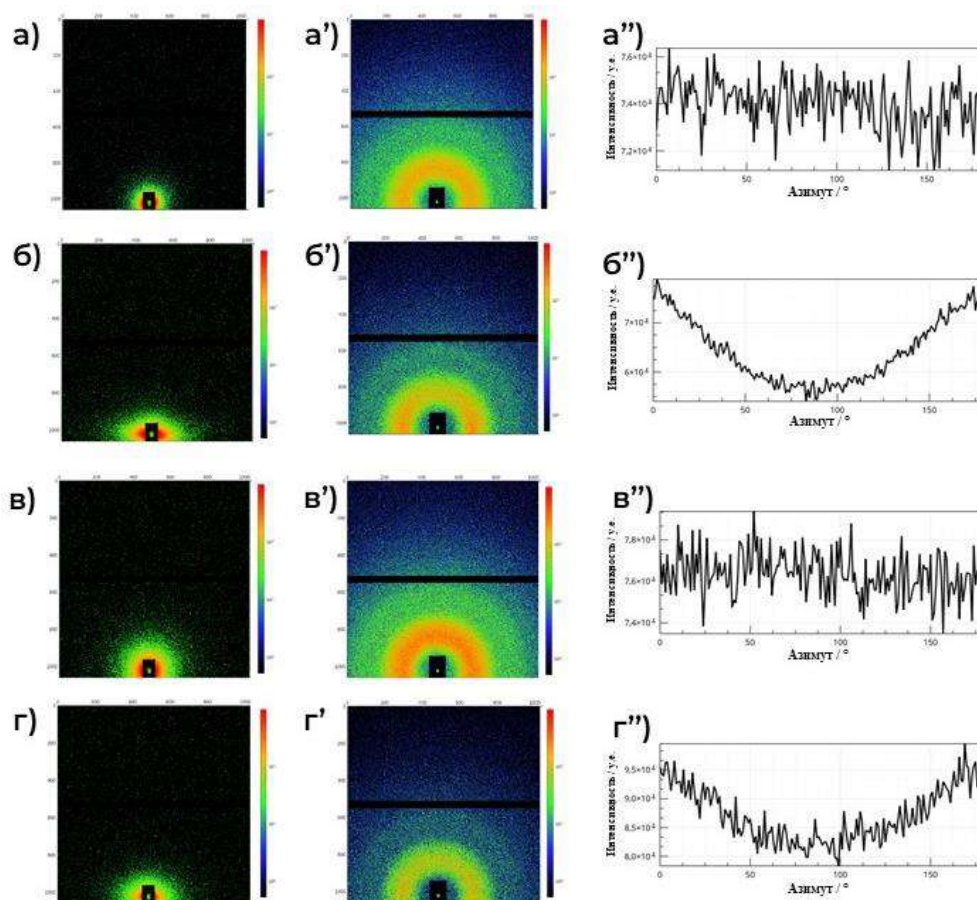


Рисунок 53 – Двумерные дифрактограммы МУРР (а – ПЛА-ДТ, б – ПЛА-ДТ-300, в – ПЛА-ДТ-высушенные, г – ПЛА-ДТ-300-высушенные), дифрактограммы БУРР (а' – ПЛА-ДТ, б' –

ПЛА-ДТ-300, в' –ПЛА-ДТ-высушенные, г' –ПЛА-ДТ-300-высушенные), а также азимутальные профили, рассчитанные по данным БУРР (а''–г'').

Анализ методом МУРР подтвердил, что ориентация волокон в полимерных матриксах усиливается в процессе растяжения. Изначально картины рассеяния свидетельствуют об отсутствии предпочтительной оси ориентации, что согласуется с низкими параметрами двумерной ориентации $f_2D = 0,031$ и $f_2D = 0,034$, соответственно (таблица 11). Для ПЛА-ДТ-300 (б) и ПЛА-ДТ-300-высушенные происходит структурная ориентация на масштабах длины $d = 20$ – 27 нм, сопровождающаяся существенным увеличением f_2D до $0,53$ и $0,33$ соответственно (таблица 11). Для расчета параметра ориентации, f_2D , из двумерных дифрактограмм МУРР были извлечены одномерные азимутальные профили интенсивности, $I(\varphi)$, путем интегрирования интенсивности рассеяния в диапазоне $0,023 \leq q \leq 0,032 \text{ \AA}^{-1}$. Профили охватывали азимутальный диапазон углов $0 \leq \varphi \leq \pi$.

Таблица 11. Коэффициент ориентации Германа и его двумерный аналог для образцов ПЛА–ДТ.

Материал	f_{2D} (БУРР)	f_{2D} (МУРР)
ПЛА–ДТ	0,0 02	0,031
ПЛА–ДТ–300	0,0 35	0,53
ПЛА–ДТ–высушенные	0,0 009	0,034
ПЛА–ДТ–300–высушенные	0,015	0,33

По–видимому, доминирующим фактором, определяющим формирование ориентационного порядка, является механическое вытягивание в сочетании с наличием остаточного растворителя. Вытягивание без предварительной сушки оказывает достаточное

влияние на структурную ориентацию, как полимерных цепей, так и волокон, тогда как вытягивание после сушки приводит к частичной потере индуцированной анизотропии. Следовательно, даже после деформации на 300 % материал сохраняет лишь низкую степень ориентационного порядка, о чем свидетельствуют низкие значения коэффициента ориентации Германа во всех исследованных состояниях.

Для серии ПЛА–ГФИП (рисунок 54) представлены двумерные диаграммы рассеяния и азимутальные распределения интенсивности для свежеелектроформованного образца (а, а'), образца, вытянутого на 300 % (б, б'), высушенного образца (в, в') и высушенного-вытянутого образца (г, г').

Свежеелектроформованный образец ПЛА–ГФИП (рисунок 54, а') демонстрирует почти изотропное распределение интенсивности с коэффициентом ориентации Германа $f = 0,0034$ (таблица 12), что указывает на очень низкую начальную степень ориентации, сопоставимую со степенью ориентации ПЛА–ДТ.

После вытяжки на 300 % образец ПЛА–ГФИП–300 (рисунок 54, б') претерпевает наиболее выраженные изменения среди всех состояний в данной серии. Двумерная карта демонстрирует заметное азимутальное перераспределение интенсивности в виде отчетливого U-образного профиля с глубоким минимумом в экваториальной области и сильным увеличением интенсивности в направлении периферийных азимутальных углов. Коэффициент ориентации Германа увеличивается до $f = 0,07$ (таблица 12), что является максимальным значением не только в рамках данной серии, но и среди всех образцов, исследованных в данной работе.

В высушенном образце ПЛА–ГФИП–высушенные (рисунок 54, в') наблюдается отсутствие выраженной азимутальной анизотропии. Азимутальный профиль интенсивности приближается к случайному распределению без регулярной модуляции, а коэффициент ориентации Германа снижается до $f = 0,00002$ (таблица 12), что фактически соответствует полностью изотропному состоянию в пределах точности метода.

В случае ПЛА–ГФИП–300–высушенные (рисунок 54, г'), прошедшего процесс вытяжки и последующей сушки, сохраняется заметная азимутальная анизотропия. Хотя амплитуда модуляции ниже, чем у ПЛА–ГФИП–300, азимутальный профиль сохраняет свою характерную U-образную форму, а коэффициент ориентации Германа составляет $f = 0,03$ (таблица 12), что подтверждает частичное сохранение ориентации, вызванной деформацией. Это значение более чем в два раза ниже, чем у невысушенного образца ПЛА–ГФИП–300 после вытяжки, что указывает на то, что сушка частично понижает переориентацию, вызванную растяжением.

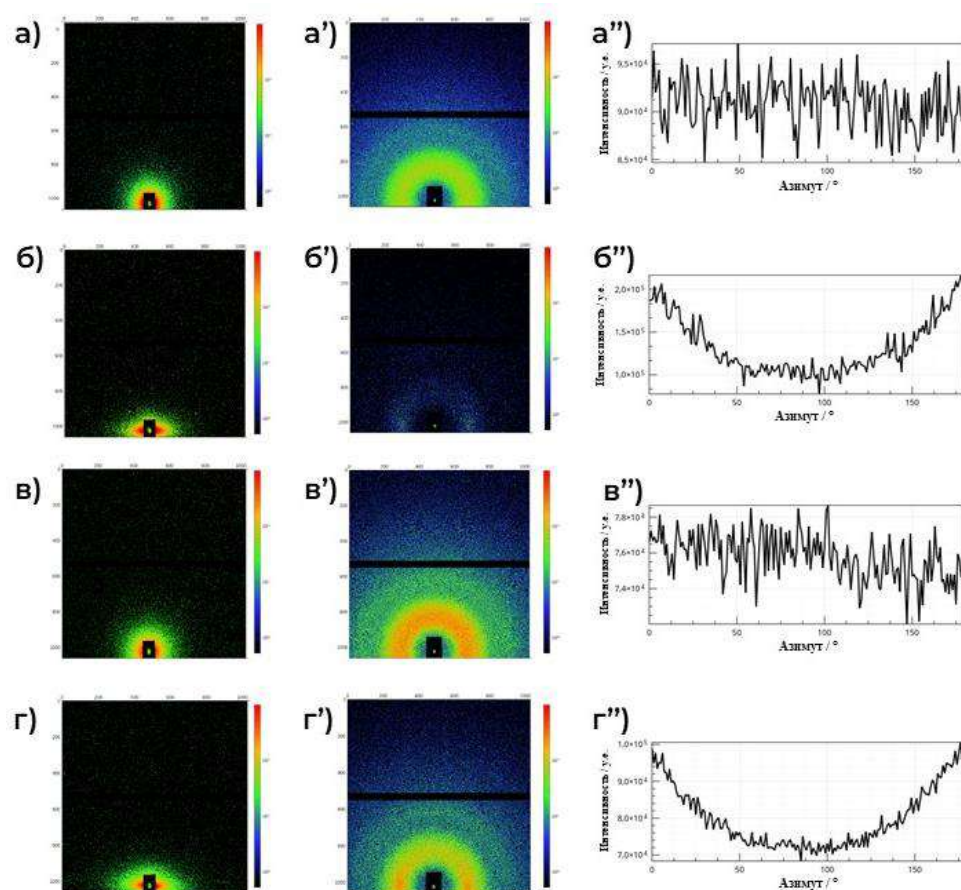


Рисунок 54 – Двумерные дифракционные картины, полученные методами МУРР (а – ПЛА-ГФИП, б – ПЛА-ГФИП-300, в – ПЛА-ГФИП-высушенные, г – ПЛА-ГФИП-300-высушенные), БУРР (а' – ПЛА-ГФИП, б' – ПЛА-ГФИП-300, в' – ПЛА-ГФИП-высушенные, г' – ПЛА-ГФИП-300-высушенные), а также азимутальные профили, полученные с помощью БУРР (а''– г'').

Анализ методом МУРР показал, что для ПЛА-ГФИП (а) и ПЛА-ГФИП-высушенные (в) не показывают преимущественной ориентации, что согласуется с низкими значениями f_{2D} , равными 0,033 и 0,045 соответственно (таблица 12), тогда как для ПЛА-ГФИП-300 (б) и ПЛА-ГФИП-300-высушенные (г) появляется структурная ориентация в материале, при этом f_{2D} возрастает до 0,51 и 0,56 соответственно (таблица 12).

Таблица 12. Коэффициент ориентации Германа и его двумерный аналог для образцов ПЛА-ГФИП.

Материал	f_{3D} (БУРР)	f_{2D} (МУРР)
----------	-----------------	-----------------

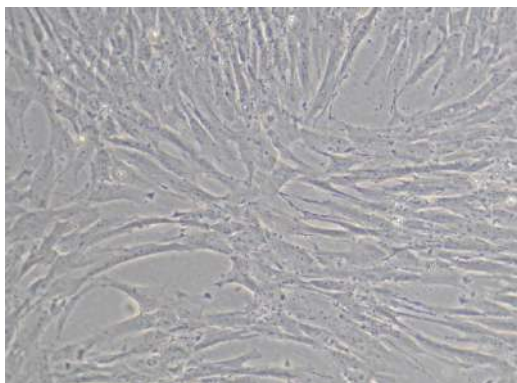
ПЛА–ГФИП	0,0034	0,033
ПЛА–ГФИП–300	0,07	0,51
ПЛА–ГФИП–высушенные	0,00002	0,045
ПЛА–ГФИП–300–высушенные	0,03	0,56

Сопоставление МУРР- и БУРР-данных выявляет выраженную иерархичность ориентационного процесса. После вытяжки формируется сильная анизотропия структуры на мезоскопическом масштабе, характеризуемая значениями f_{2D} порядка 0.3–0.6, тогда как азимутальная анизотропия аморфного гало БУРР остается значительно слабее. Постформовочная вытяжка наиболее сильно влияет на мезоскопическую анизотропию волокнистой структуры, тогда как ориентация аморфных цепных сегментов, оцениваемая по БУРР, остаётся сравнительно слабой.

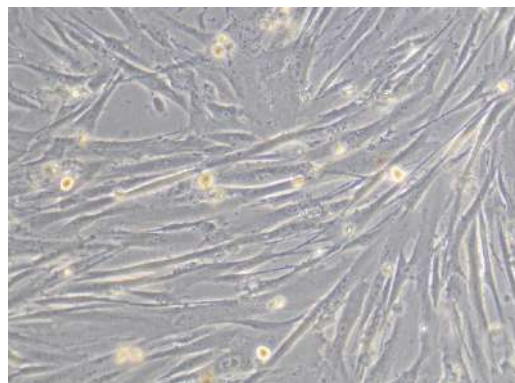
Таким образом, постформовочная вытяжка в этаноле приводит к формированию выраженной структурной анизотропии ПЛА-матриков. На мезоскопическом уровне, исследуемом методом МУРР, ориентационный эффект выражен значительно сильнее, чем на уровне аморфной цепной упаковки, оцениваемой методом БУРР. Для обеих систем растворов максимальная анизотропия наблюдается после вытяжки без предварительной вакуумной сушки. Предварительная сушка особенно заметно снижает ориентационный отклик ПЛА–ДТ по данным МУРР и БУРР, тогда как для ПЛА–ГФИП мезомасштабная анизотропия после вытяжки сохраняется высокой. Эти результаты показывают, что влияние предварительной сушки зависит от системы растворов и проявляется по-разному на различных уровнях структурной организации материала.

3.10 *In vitro* исследование материалов на клеточных культурах

Для оценки клеточного ответа на разработанные ПЛА-матрицы использовали дермальные фибробласты человека (HDF) и мезенхимальные стромальные клетки пуповины человека (UC-MSC). Исследовали три типа матриков: ПЛА-ДТ с хаотичной организацией волокон, ориентированные ПЛА-ДТ и ПЛА-ДТ-ПАВ. Морфологию и пространственную организацию клеток оценивали методами фазово-контрастной, сканирующей электронной и конфокальной микроскопии. На 7-е сутки дополнительно определяли плотность клеточного заселения матриков.



HDF



UC-MSC

Рисунок 55 – Клеточные культуры дермальных фибробластов человека (HDF) и мезенхимальных стромальных клеток пуповины человека (UC-MSC) на пластике.

3.10.1 Клеточный ответ HDF на матриксах с различной топологией

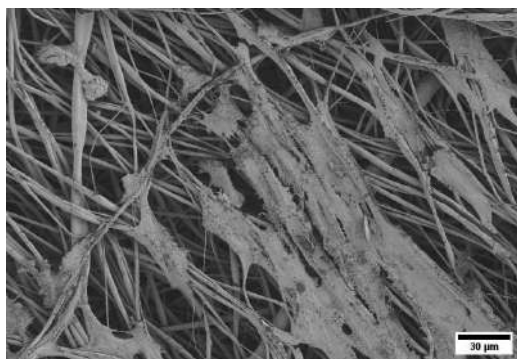
СЭМ-анализ поверхности матриксов с клеточной культурой HDF позволил оценить характер адгезии и морфологию клеток на разных типах материалов (рисунок 56). На матриксе ПЛА-ДТ (рисунок 56 А, А'') на 3-и сутки культивирования клетки были равномерно распределены по поверхности волокон, формируя многочисленные цитоплазматические отростки. К 7-м суткам степень распластывания возрастала, клетки образовывали разветвленные контакты и занимали значительную площадь поверхности матрикса.

На матриксе ПЛА-ДТ-направленные (рисунок 56 Б, Б'') характер клеточного роста принципиально отличался. Уже на 3-и сутки клетки HDF располагались преимущественно вдоль ориентированных волокон, формируя упорядоченный монослой; их морфология была вытянутой и соответствовала направлению волокон. К 7-м суткам клетки плотно покрывали поверхность матрикса, сохраняя направленный характер роста и образуя клеточный монослой вдоль волокон, что свидетельствует об ориентировании фибробластов топографией подложки.

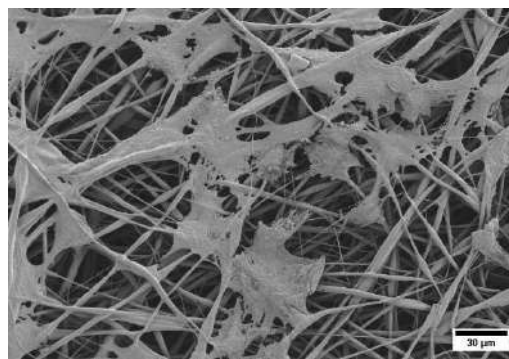
В противоположность этим двум вариантам, на матриксе ПЛА-ДТ-ПАВ (рисунок 56 В, В'') клеточная адгезия была существенно ниже на протяжении всего периода наблюдения: как на 3-и, так и на 7-е сутки. На матриксе ПЛА-ДТ-ПАВ количество клеток, обнаруживаемых методом, СЭМ, было существенно ниже, чем на ПЛА-ДТ и ориентированном ПЛА-ДТ. На 3-и и 7-е сутки поверхность значительной части волокон оставалась незаселенной. Эти наблюдения свидетельствуют о менее благоприятном клеточном ответе на ПАВ-содержащий матрикс, однако сами по себе не позволяют разграничить недостаточную первоначальную адгезию, снижение сохранности клеток и возможный цитотоксический эффект материала.

Данный результат указывает на неблагоприятный клеточный ответ для HDF на матриксе, содержащем поверхностно-активное вещество.

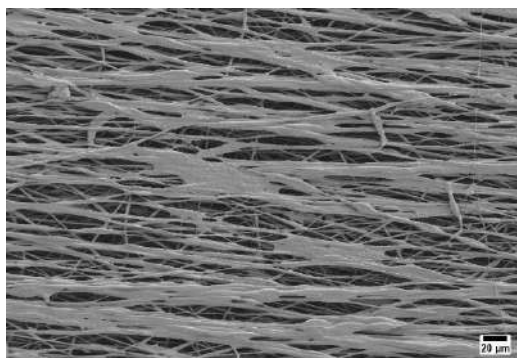
А



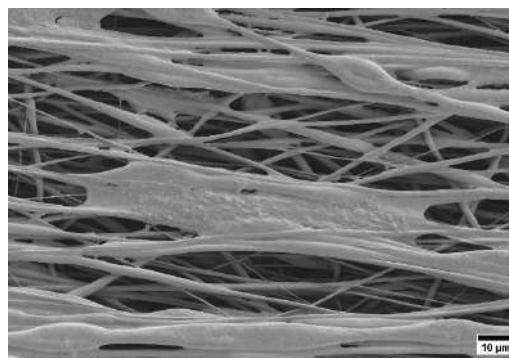
А''



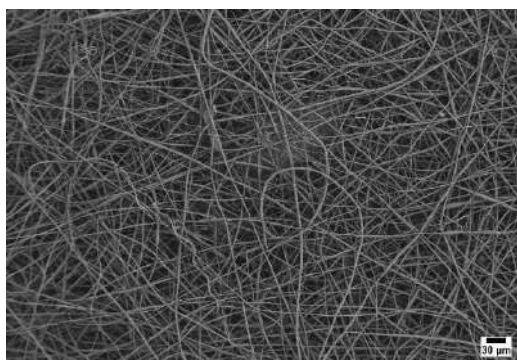
Б



Б''



В



В''



Рисунок 56 – СЭМ-микрофотографии, полимерных матриксов с клеточной культурой HDF: ПЛА-ДТ (А – 3-день; А'' – 7-день), ПЛА-ДТ-направленные (Б – 3-день; Б'' – 7-день) и ПЛА-ДТ-ПАВ (В – 3-день; В'' – 7-день).

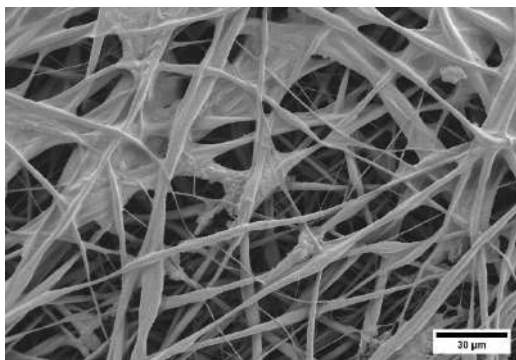
3.10.2 Клеточный ответ UC–MSC на матриксах с различной топологией

СЭМ–микрофотографии матриксов с клеточной культурой UC–MSC отражают аналогичную, но более сложную картину (Рисунок 57 А, А”). На матриксе ПЛА-ДТ на 3-и сутки клетки UC–MSC были единично распределены по поверхности волокон, сохраняя округлую или слабовытянутую морфологию с немногочисленными отростками. К 7-м суткам наблюдалось увеличение числа клеток и более выраженное их распластывание по поверхности матрикса: клетки формировали разветвленные цитоплазматические контакты с волокнами, частично перекрывая межволоконное пространство.

На матриксе ПЛА-ДТ-направленные (Рисунок 57 Б, Б”) на 3-и сутки UC–MSC располагались преимущественно в межволоконных промежутках. К 7-м суткам отмечалось существенное увеличение клеточной плотности: клетки образовывали обширные пласты, плотно покрывая поверхность волокон, при этом их морфология приобретала выраженно вытянутый характер вдоль направления ориентированных волокон.

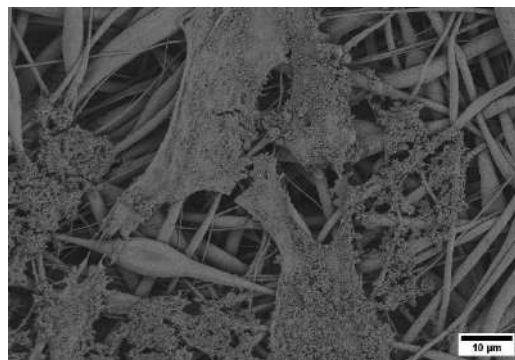
Для ПЛА-ДТ-ПАВ (Рисунок 57 В, В”) наблюдалась принципиально иная картина. На 3-и и 7-е сутки на поверхности матрикса не наблюдалось адгезированных клеток UC–MSC. Полученный результат указывает на неблагоприятное влияние данного состава на заселение матрикса UC-MSC. Поскольку прямой количественный тест жизнеспособности UC-MSC в данной серии не проводился, на основании представленных данных невозможно однозначно связать наблюдаемый эффект с цитотоксичностью.

А

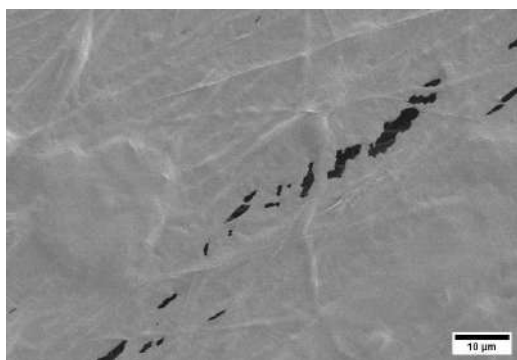


Б

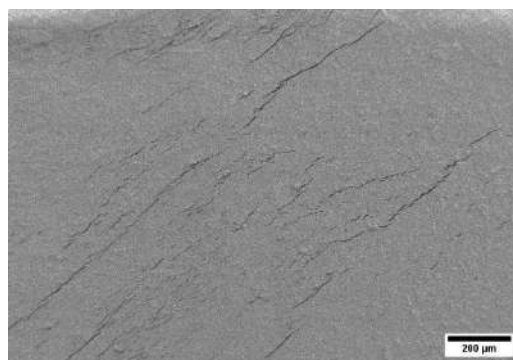
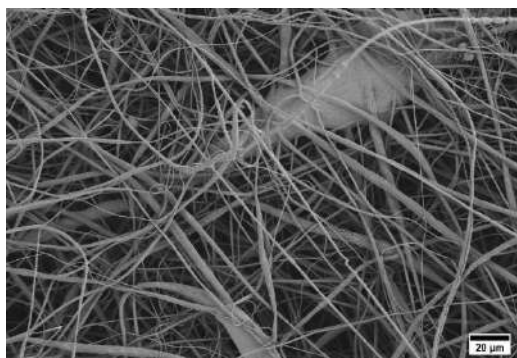
А”



Б”



В



В''

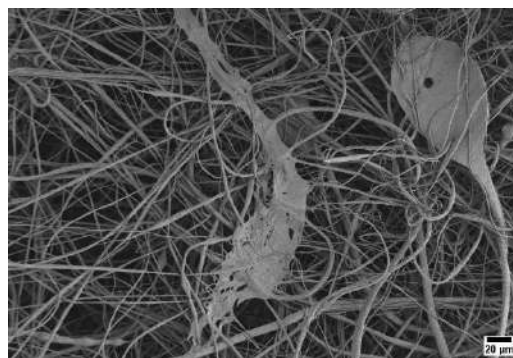


Рисунок 57 – СЭМ–микрофотографии, полимерных матриц с клеточной культурой UC–MSC: ПЛА–ДТ (А' – 3–день; А'' – 7–день), ПЛА–ДТ–направленные (В' – 3–день; В'' – 7–день) и ПЛА–ДТ–ПАВ (В' – 3–день; В'' – 7–день).

3.10.3 Количественный анализ заселения HDF и UC–MSC матриц

Для количественной оценки клеточного заселения на волокнистых матрицах с различной топологией была проведена конфокальная микроскопия предварительно окрашенных РКН-26 клеточных культур на 7-е сутки культивирования; соответствующие изображения и данные представлены на рисунке 58 и в таблице 13. Клеточная линия HDF, высеянная на матрицы с направленной ориентацией волокон, характеризовалась наиболее высокой клеточной плотностью в исследованном поле зрения по поверхности среди всех исследованных условий: в поле обзора идентифицировано 545 клеток, что соответствует плотности 336,4 клеток/мм² (RGI = 1,278). На хаотичных матрицах ПЛА-ДТ плотность была ниже (307 клеток, 189,5 клеток/мм², RGI = 0,720), а на матрицах ПЛА-ДТ-ПАВ – минимальной (97 клеток, 59,9 клеток/мм², RGI = 0,228).

Для UC–MSC максимальная плотность заселения отмечалась на хаотичных матрицах ПЛА-ДТ (178 клеток, 109,9 клеток/мм², RGI = 0,418). На направленных матрицах ПЛА-ДТ-направленные плотность была ниже (79 клеток, 48,8 клеток/мм², RGI = 0,185), а на матрицах ПЛА-ДТ-ПАВ сопоставимой (82 клетки, 50,6 клеток/мм², RGI = 0,192). В исследованном поле зрения наибольшая плотность HDF наблюдалась на ориентированных ПЛА-

ДТ-матриксах, тогда как для UC-MSC максимальная плотность отмечалась на хаотичных ПЛА-ДТ. Таким образом, влияние ориентации волокон различалось для двух типов клеток: для HDF ориентированная архитектура сочеталась с более высокой плотностью заселения и выраженным направленным расположением клеток, тогда как для UC-MSC ее основной эффект проявлялся в изменении клеточной морфологии и ориентации, но не в увеличении плотности.

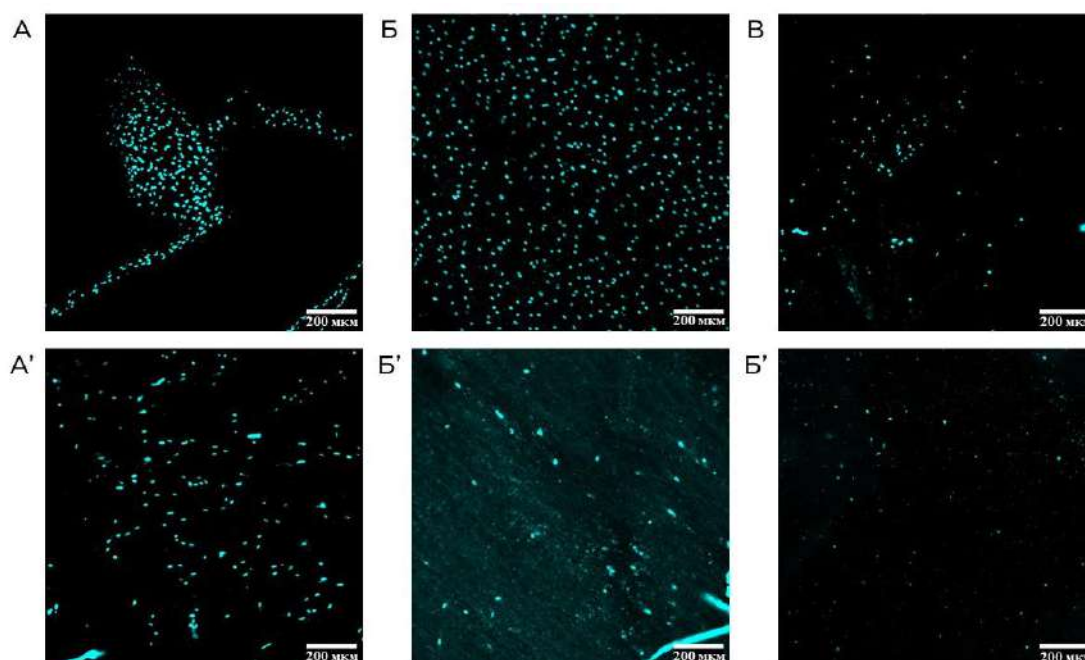


Рисунок 58 – Конфокальные изображения полимерных матриц с клеточными культурами на 7 день HDF ПЛА–ДТ-хаотичные (А), ПЛА–ДТ-направленные (Б) и ПЛА–ДТ–ПАВ-хаотичные (В) и UC–MSC: ПЛА–ДТ-хаотичные (А'), ПЛА–ДТ-направленные (Б') и ПЛА–ДТ–ПАВ-хаотичные (В').

Таблица 13 Количественные показатели плотности заселения клеток HDF и UC-MSC на волоконных матриксах различной топологии на 7-е сутки культивирования

Условие	N клеток	Плотность, кл/мм ²	RGI
HDF, направленные	545	336,4	1,278
HDF, хаотичные	307	189,5	0,720
HDF, ПАВ	97	59,9	0,228
UC-MSC, хаотичные	178	109,9	0,418
UC-MSC, направленные	79	48,8	0,185
UC-MSC, ПАВ	82	50,6	0,192

RGI использовали как нормированный показатель клеточной заселенности на 7-е сутки относительно расчетной исходной плотности посева. Поскольку показатель интегрирует влияние первоначальной адгезии, сохранности и последующего роста клеток, он не позволяет независимо оценивать пролиферацию.

3.10.4 Сопоставление с ранее опубликованными данными на модели первичной нейрональной культуры

Для дополнительной оценки влияния морфологии поверхности волокон использовали результаты ранее опубликованной совместной работы [247], в которой исследовали первичную кортикальную культуру мышей C57Bl/6 на матриксах ПЛА-ГФИП, ПЛА-ДХМ и ПЛА-ДТ. Согласно СЭМ-анализу (рисунок 59 А-В), гладкие волокна ПЛА-ГФИП характеризовались минимальной клеточной адгезией, тогда как на волокнах с пористой поверхностью (ПЛА-ДХМ и ПЛА-ДТ) наблюдалось выраженное увеличение числа адгезированных клеток и формирование плотных многоклеточных конгломератов, заполняющих межволоконное пространство. Полученные данные демонстрируют ассоциацию между пористой морфологией волокон ПЛА-ДХМ и ПЛА-ДТ и более высокой плотностью клеточной популяции по сравнению с гладкими ПЛА-ГФИП-волоконками.

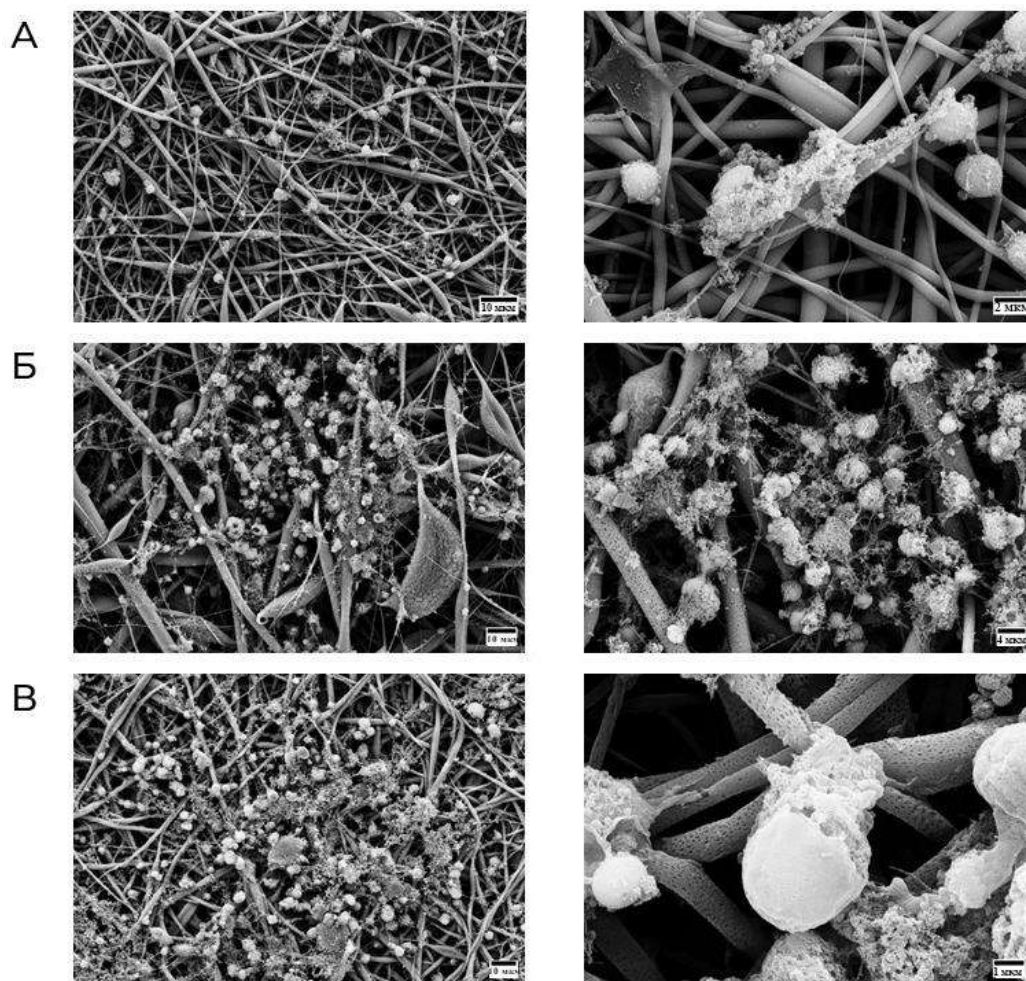


Рисунок 59 – СЭМ-микрофотографии, первичной нейрональной культуры коры головного мозга мышей C57Bl/6 для материалов ПЛА-ГФИП (А), ПЛА-ДХМ (Б) и ПЛА-ДТ (В).

Данное качественное наблюдение подтверждается количественной оценкой плотности клеточной популяции методом иммунофлуоресцентного окрашивания (DAPI/GFAP/NeuN), представленной на рисунке 60 (адаптировано из: [247]). Плотность клеток на матриксах ПЛА-ГФИП с гладкой морфологией волокон (приблизительно 500 клеток/мм²) была статистически неотличима от контрольной группы и не демонстрировала значимого прироста. В то же время на матриксах с пористой морфологией волокон плотность клеточной популяции возрастала более чем в три раза по сравнению как с контролем, так и с группой ПЛА-ГФИП, достигая приблизительно 1650 клеток/мм² для ПЛА-ДХМ и 1430 клеток/мм² для ПЛА-ДТ (** $p < 0,01$ при сравнении обеих групп с контролем и с ПЛА-ГФИП; * $p < 0,05$ при сравнении ПЛА-ДХМ и ПЛА-ДТ между собой).

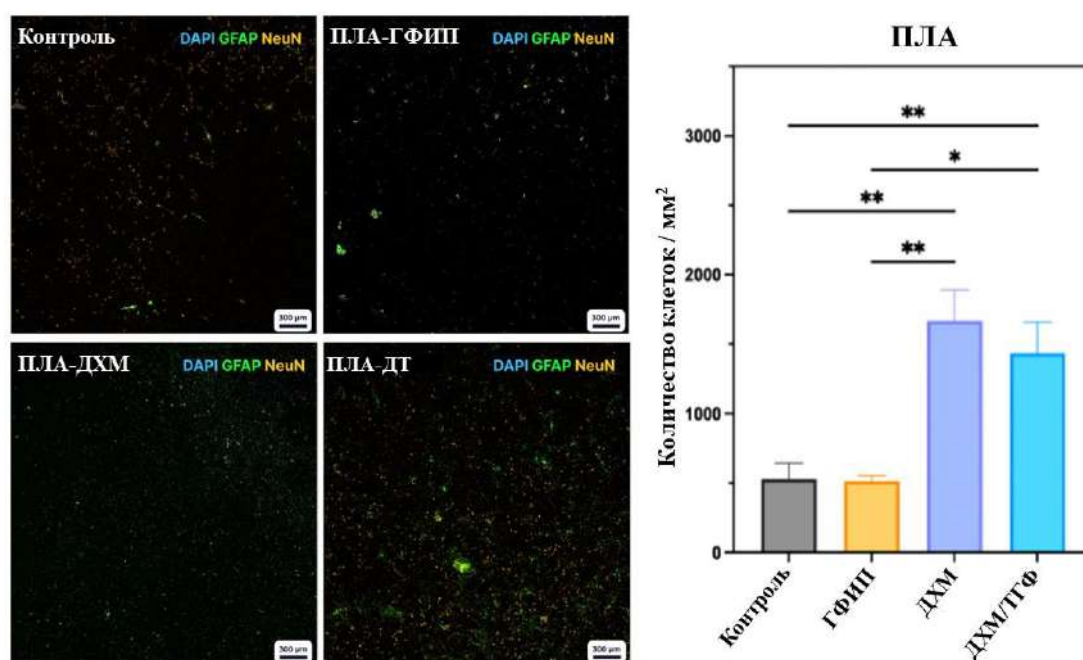


Рисунок 60 – Сравнительный анализ плотности первичной нейрональной культуры на матриксах ПЛА-ГФИП, ПЛА-ДХМ, ПЛА-ДТ, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns – различия статистически незначимы ($p \geq 0,05$). (адаптировано из: [247]).

3.10.5 Выводы по главе 3.10

Проведенные *in vitro* исследования показали, что матриксы ПЛА-ДТ поддерживают заселение HDF и UC-MSC, а ориентированная архитектура волокон оказывает выраженное влияние на пространственную организацию клеток. Для HDF на направленных матриксах в исследованном поле зрения наблюдалась более высокая клеточная плотность и выраженное расположение клеток вдоль оси волокон. Для UC-MSC ориентация матрикса проявлялась

преимущественно в вытянутой направленной морфологии клеток, тогда как максимальная плотность заселения наблюдалась на хаотичных ПЛА-ДТ-матриксах.

ПАВ-содержащие матриксы ПЛА-ДТ-ПАВ характеризовались значительно меньшей плотностью клеток для обеих культур, что свидетельствует о менее благоприятном клеточном ответе на данный состав. При этом представленные данные не позволяют однозначно установить, обусловлен ли этот эффект снижением первоначальной адгезии, последующей потерей клеток или цитотоксическим действием материала.

Дополнительные ранее опубликованные данные на модели первичной нейрональной культуры показали более высокую плотность клеточной популяции на пористых матриксах ПЛА-ДХМ и ПЛА-ДТ по сравнению с гладкими ПЛА-ГФИП-волоконками, что подтверждает существенную роль морфологии поверхности при взаимодействии клеток с электроформованными ПЛА-матриксами.

3.11 Оценка тканевого ответа на клеточно-матриксные конструкции в модели хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона

Для оценки тканевого и сосудистого ответа на клеточно-матриксные конструкции использовали модель хориоаллантоисной мембраны (ХАМ) куриного эмбриона. Исследовали матриксы ПЛА-ДТ, ориентированные ПЛА-ДТ и ПЛА-ДТ-ПАВ, предварительно заселенные HDF или UC-MSC. Анализ включал макроскопическую оценку зоны имплантации, СЭМ и гистологическое исследование.

3.11.1 Макроскопическая оценка взаимодействия матриксов с ХАМ (HDF)

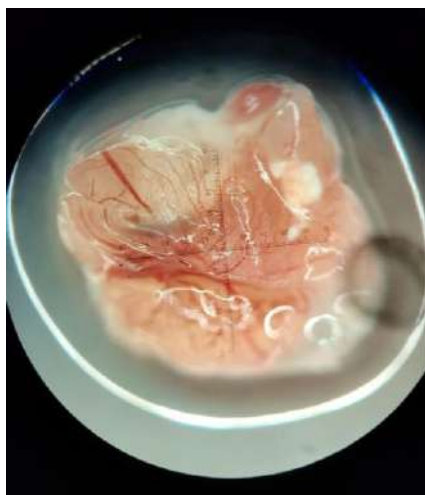
На рисунке 61 представлены макроизображения матриксов ПЛА-ДТ, ПЛА-ДТ-направленные и ПЛА-ДТ-ПАВ с клеточной культурой HDF на 7-е сутки после имплантации на ХАМ.

Во всех трех группах матриксы сохраняли целостность на протяжении периода наблюдения. Вместе с тем характер их взаимодействия с тканью мембраны существенно различался. Матрикс ПЛА-ДТ на внутренней стороне (А) плотно прилегал к поверхности ХАМ, его края были погружены в ткань мембраны, контур имплантата выглядел неровным и местами размытым, что отражает интеграцию материала с подлежащей тканью. В зоне контакта отчетливо прослеживалась густая сосудистая сеть: крупные сосуды конвергировали к имплантату, а под его краями были заметны разветвления капилляров. Внешняя сторона того же образца (А'') выглядела более однородной и светлой; сосудистый рисунок присутствовал, но был менее выражен, а края матрикса сохраняли четкие очертания.

Для матрикса ПЛА-ДТ-направленные (Б, Б'') наблюдалась сходная, но более выраженная картина интеграции. На внутренней стороне имплантат визуально был «утоплен» в мембрану, поверхность выглядела неровной, а в зоне контакта фиксировалось обилие сосудов, плотно подходящих к краям матрикса. Интенсивность васкуляризации в этой зоне превышала таковую у ПЛА-ДТ. Внешняя поверхность (Б'') была светлее и более сглаженной; сосуды располагались преимущественно по периферии образца и практически не проходили под матриксом.

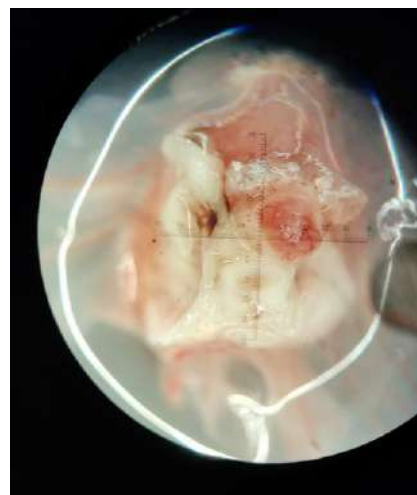
В группе ПЛА-ДТ-ПАВ (В, В'') картина принципиально отличалась. На внутренней стороне матрикс оставался на поверхности ХАМ без видимого погружения в толщу мембраны, его контур был четким и ровным. Сосудистая сеть присутствовала в окружающей ткани, однако выраженной конвергенции сосудов к зоне имплантации и капиллярного прорастания под края матрикса не наблюдалось. Внешняя сторона ПЛА-ДТ-ПАВ выглядела наиболее однородной и компактной из всех трех групп, сосудистая активность вблизи образца была минимальной, а окружающая мембрана сохраняла обычный вид без признаков выраженной ангиогенной реакции. При этом грубых повреждений ХАМ или перифокальных кровоизлияний по периметру имплантатов в данной серии не было зафиксировано, что свидетельствует об удовлетворительной локальной переносимости всех трех типов матриксов.

А



Б

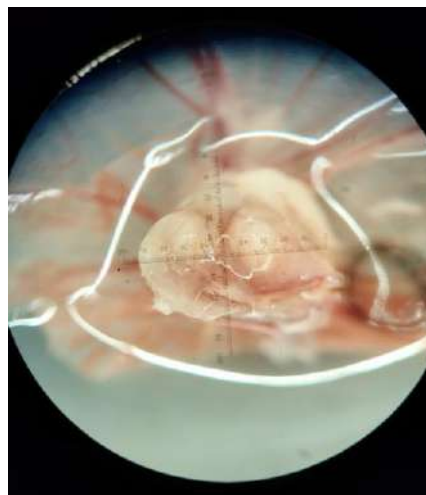
А''



Б''



В



В''



Рисунок 61 – Макро-изображения полимерных матриксов с клеточной культурой HDF в хориоалантоисной мембране куриных эмбрионов на 7 день: ПЛА-ДТ (А – внутренняя сторона, А'' – внешняя сторона), ПЛА-ДТ-направленные (Б – внутренняя сторона, Б'' – внешняя сторона) и ПЛА-ДТ-ПАВ (В – внутренняя сторона, В'' – внешняя сторона).

3.11.2 Макроскопическая оценка взаимодействия матриксов с ХАМ (UC-MSC)

Рисунок 62 демонстрирует состояние тех же матриксов ПЛА-ДТ, ПЛА-ДТ-направленные и ПЛА-ДТ-ПАВ, но с внесенной клеточной культурой UC-MSC на 7-е сутки после имплантации.

Для матрикса ПЛА-ДТ (А, А'') отмечался плотный контакт материала с тканью ХАМ: сосуды активно конвергировали к зоне имплантации, вдоль краев матрикса прослеживались разветвленные капилляры, а имплантат визуальнo частично интегрировался в мембрану. Внешняя сторона (А'') характеризовалась более однородной, светлой поверхностью; сосуды располагались преимущественно по периферии образца.

Матрикс ПЛА-ДТ-направленные с UC-MSC (Б, Б'') демонстрировал наиболее выраженную сосудистую реакцию среди трех типов матриксов. На внутренней стороне многочисленные крупные и мелкие сосуды радиально сходились к имплантату, мембрана в зоне контакта выглядела обильно кровоснабженной, что может свидетельствовать об усиленном

ангиогенном ответе в присутствии UC–MSC. Внешняя сторона сохраняла светлый и компактный вид; сосудистая активность на наружной поверхности была минимальной.

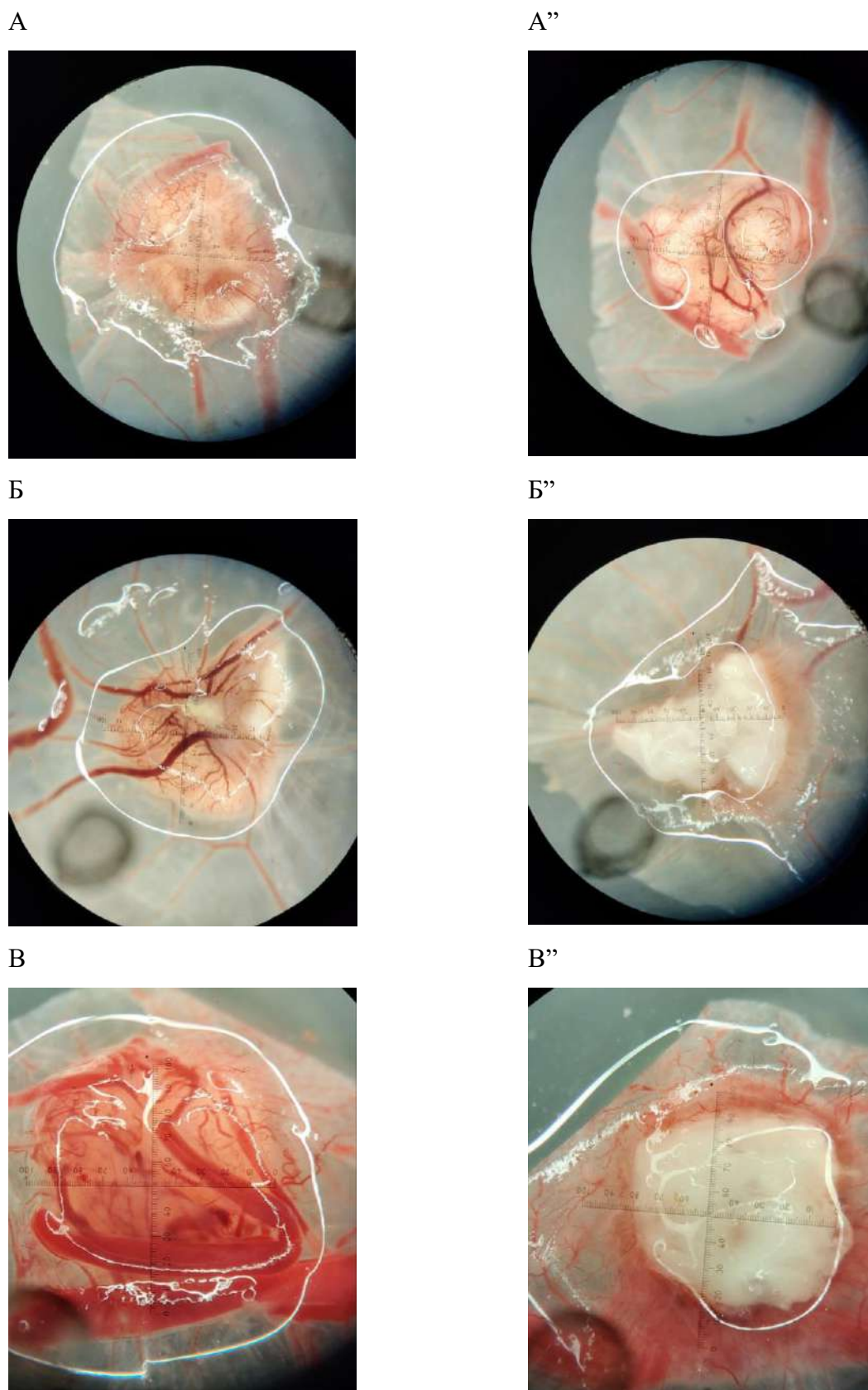


Рисунок 62 – Макро-изображения полимерных матриц с клеточной культурой

US-MSC в хориоалантоисной мембране куриных эмбрионов на 7 день: ПЛА-ДТ (А – внутренняя сторона, А'' – внешняя сторона), ПЛА-ДТ-направленные (Б – внутренняя сторона, Б'' – внешняя сторона) и ПЛА-ДТ-ПАВ (В – внутренняя сторона, В'' – внешняя сторона).

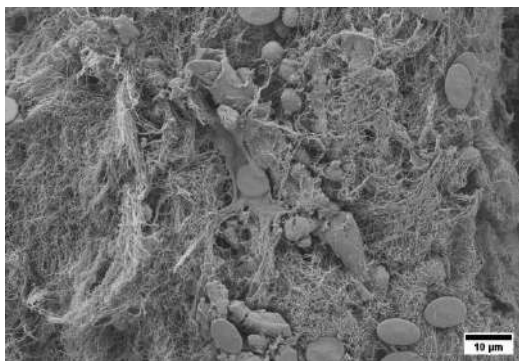
В группе ПЛА-ДТ-ПАВ с UC-MSC (В, В'') макроскопически отмечалась выраженная сосудистая реакция ХАМ, отличающаяся от организованного ангиогенеза в группах без ПАВ. Матрицы приобретали розово-красную окраску, что могло быть связано с их васкуляризацией, кровенаполнением и локальным геморрагическим пропитыванием. Сосудистая сеть характеризовалась увеличенной плотностью, извилистостью, неравномерностью калибра и нерегулярным ветвлением сосудов. По периметру и в области имплантатов определялись очаги кровоизлияний, отражающие повышенную проницаемость и хрупкость формирующихся сосудов. Таким образом, внесение конструкций ПЛА-ДТ-ПАВ с UC-MSC сопровождалось выраженной, но структурно неоднородной сосудистой реакцией с признаками незрелости новообразованного микроциркуляторного русла. При этом признаков обширного некроза или грубой деструкции ХАМ не выявлено.

3.11.3 СЭМ-анализ матриц с HDF после имплантации в ХАМ

Микроизображения СЭМ матриц ПЛА-ДТ, ПЛА-ДТ-направленные и ПЛА-ДТ-ПАВ с внесенными HDF на 7-е сутки представлены на Рисунке 63.

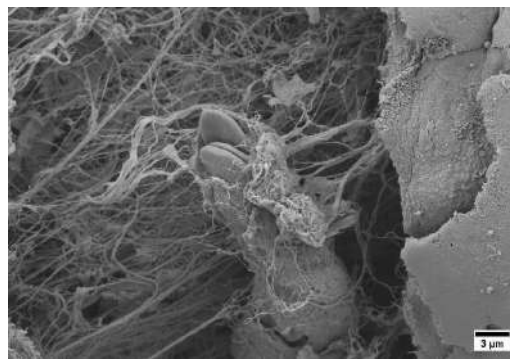
В матрицах ПЛА-ДТ (А, А'') выявлялись распластанные клетки веретеновидной и звездчатой формы, их отростки фиксировались на отдельных волокнах и образовывали межволоконные контакты. Такая морфология соответствует адгезированным фибробластам. Поверхность клеток и прилегающих волокон была покрыта сетью тонких фибрилл, включающей синтезированный клетками внеклеточный матрикс и фибрин, что указывает на активное взаимодействие имплантата с тканью ХАМ.

А

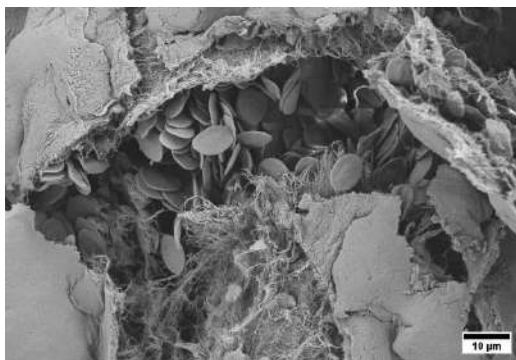


Б

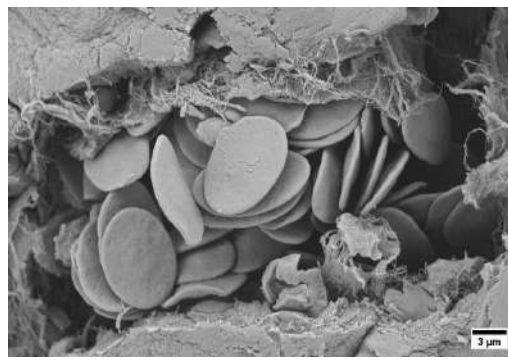
А''



Б''



В



В''

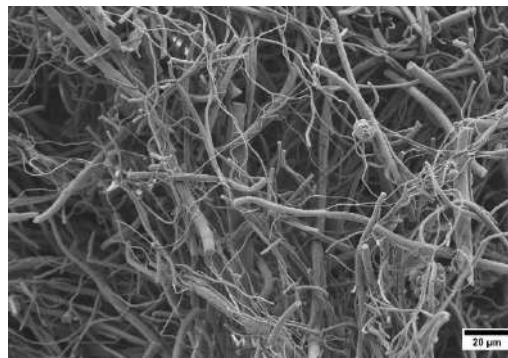
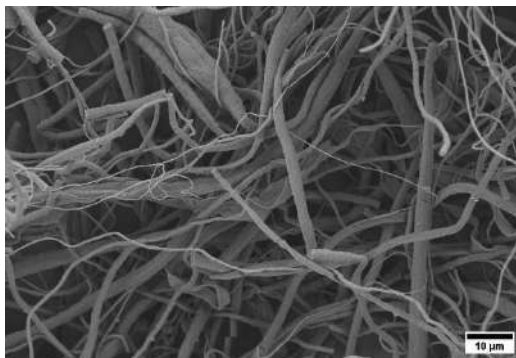


Рисунок 63 – Микроизображение СЭМ полимерных матриксов с клеточной культурой HDF в хорионаллантоисной мембране куриных эмбрионов на 7 день: ПЛА-ДТ (А, А''), ПЛА-ДТ–направленные (Б, Б'') и ПЛА-ДТ–ПАВ (В, В'').

Между волокнами выявлялись отдельные округлые клеточные элементы, вероятно относящиеся к клеткам хозяина. Точная фенотипическая принадлежность этих клеток не может быть установлена только на основании СЭМ-морфологии. Их присутствие было бы закономерно для раннего этапа взаимодействия имплантата с ХАМ и отражает участие иммунных и гемостатических клеток в ремоделировании фибринового матрикса и удалении клеточного детрита. При этом на представленных изображениях не наблюдалось плотных скоплений иммунных клеток, выраженных периваскулярных инфильтратов или участков разрушения ткани, что не указывает на интенсивную острую воспалительную реакцию.

В порах матрикса определялись многочисленные эллипсоидные ядродержащие эритроциты куриного эмбриона. На одном из изображений прослеживалась тубулярная структура с эритроцитами в просвете, соответствующая кровенаполненному сосудистому профилю, проникающему в толщу волокнистого матрикса. Наличие такого профиля поддерживает вывод о вращении сосудистого компонента ХАМ в матрикс. Свободно лежащие эритроциты на поверхности и по краям образца не следует рассматривать как признаки кровоизлияния: вероятнее всего, их попадание связано с пересечением капилляров при вырезании фрагмента ХАМ. В пользу артефактного характера говорит сохранная форма клеток, отсутствие их агрегации и организованного скопления вокруг очагов повреждения.

Совокупность макроскопических, СЭМ- и последующих гистологических наблюдений свидетельствует о выраженном взаимодействии конструкции с тканями ХАМ и наличии сосудистых структур в зоне имплантации. Однако по данным СЭМ нельзя однозначно установить функциональность и происхождение отдельных сосудистых профилей.

В матриксе ПЛА-ДТ-ПАВ с HDF (В, В'') макрофотография показывала сосуды, проходящие по поверхности и периферии имплантата, а также участки кровоизлияния, особенно в нижней части. Однако по данным СЭМ распластанные клетки в полости матрикса практически не определялись, а кровенаполненные сосудистые профили в толще носителя отсутствовали. Это указывает на низкую степень сохранения, адгезии и распространения внесенных HDF на волокнах ПЛА-ДТ-ПАВ и отсутствие убедительных морфологических признаков ангиогенной инвазии матрикса на 7-е сутки. Менее выраженная клеточная колонизация может быть связана с изменением поверхностных и структурных свойств матрикса при введении ПАВ; для разграничения возможного вклада цитотоксичности, адгезии и деградационных изменений необходимы дополнительные исследования.

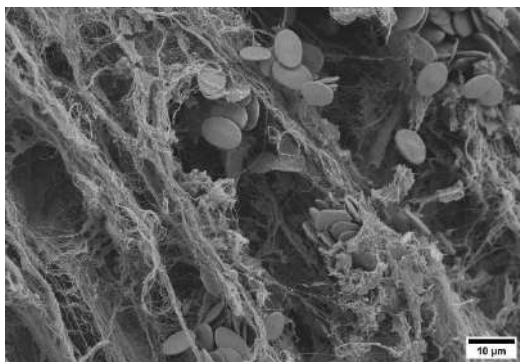
3.11.4 СЭМ-анализ матриксов с UC–MSC после имплантации в ХАМ

На Рисунке 64 представлены СЭМ-изображения матриксов ПЛА-ДТ, ПЛА-ДТ-направленные и ПЛА-ДТ-ПАВ с внесенными UC–MSC на 7-е сутки после имплантации.

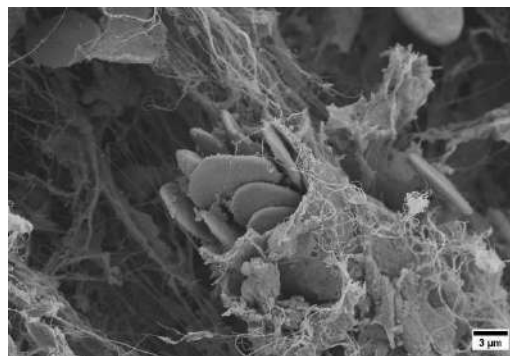
В матриксах ПЛА-ДТ (А, А'') на поверхности и в межволоконных пространствах определяется выраженная сеть тонкого фибриллярного материала, формирующая тяжи и мостики между более крупными структурами и частично маскирующая исходную архитектуру волокон. Этот компонент может включать фибрин, тканевые элементы ХАМ и внеклеточный матрикс, синтезированный UC–MSC, что указывает на активное взаимодействие имплантата с окружающей тканью. В нескольких участках обнаруживаются многочисленные эритроциты эмбриона, расположенные как на поверхности матрикса, так и внутри полостей фибриллярной сети. Это может быть связано с присутствием кровенаполненных микрососудистых профилей либо локальными кровоизлияниями; однако отсутствие четкой непрерывной эндотелиальной стенки на изображениях не позволяет по одним лишь СЭМ-данным однозначно подтвердить функциональную перфузию этих сосудов.

А

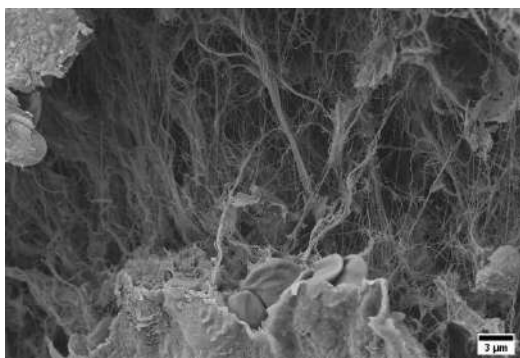
А''



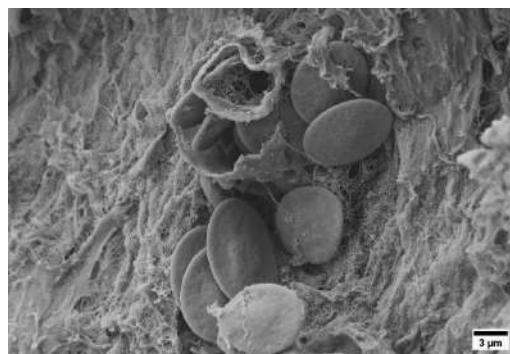
Б



Б''



В



В''

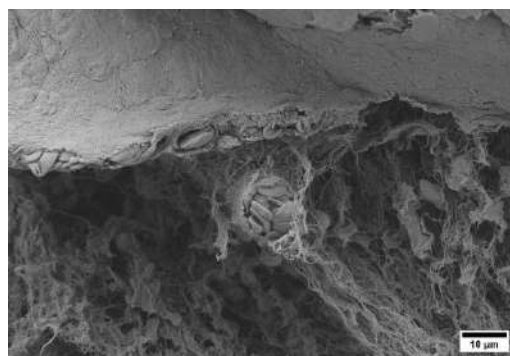
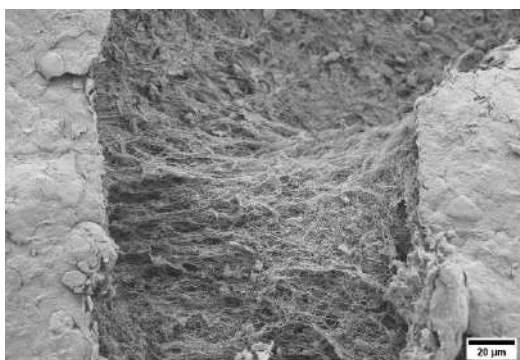


Рисунок 64 – Микроизображение СЭМ полимерных матриксов с клеточной культурой UC–MSC в хорионлантоисной мембране куриных эмбрионов на 7 день: ПЛА–ДТ (А, А''), ПЛА–ДТ–направленные (Б, Б'') и ПЛА–ДТ–ПАВ (В, В'').

Отдельные уплощенные и отростчатые клеточно-тканевые структуры тесно контактируют с фибриллярной сетью, но типичные контуры отдельных UC–MSC различимы недостаточно хорошо из-за плотного биологического покрытия поверхности. В целом картина соответствует выраженному фибриллярному ремоделированию и вовлечению сосудистого компонента, при этом наличие очагов диффузной сосудисто-тканевой реакции подтверждает активное взаимодействие UC–MSC и матрикса с тканями ХАМ.

Аналогичные особенности выявляются и для ПЛА-ДТ-направленные с UC–MSC (Б, Б’): исходная направленная архитектура матрикса в значительной степени маскирована плотным биологическим покрытием; в межволоконных пространствах определяется развитая сеть тонких фибрилл, формирующих многочисленные тяжи и мостики. В углублениях и полостях обнаруживаются скопления эритроцитов, в том числе внутри каналообразного пространства, окруженного фибриллярно-тканевым материалом. Это может соответствовать кровенаполненному микрососудистому профилю, проникшему в область матрикса, либо локальному кровоизлиянию. Сопоставление с макроскопической картиной (Рисунок 64) обильной васкуляризации области имплантации поддерживает интерпретацию в пользу активного ангиогенного ответа и сосудистой интеграции конструкции.

В матриксе ПЛА-ДТ-ПАВ с UC–MSC (В, В’’) на 7-е сутки выявляется плотная мелкофибриллярная сеть, частично связанная с прилежащей тканью, однако отчетливые распластанные UC–MSC и кровенаполненные микрососудистые профили в толще матрикса не визуализируются. Единичные эритроциты не имеют морфологических признаков сформированных сосудов. По сравнению с аналогичными матриксами ПЛА-ДТ и ПЛА-ДТ-направленные существенного усиления клеточной колонизации или зрелой сосудистой реакции при использовании UC–MSC не обнаружено. Сходное отсутствие выраженного клеточного и ангиогенного ответа в обеих группах ПЛА-ДТ-ПАВ (HDF и UC–MSC) может быть связано с неблагоприятным влиянием ПАВ на адгезию и жизнеспособность клеток и на формирование стабильного микроциркуляторного русла.

3.11.5 Гистологический анализ срезов зон имплантации матриксов с HDF и UC–MSC, имплантированных в ХАМ

На Рисунке 65 представлены микроскопические изображения гистологических срезов хориоалантоисной мембраны куриных эмбрионов с имплантированными матриксами ПЛА-ДТ, ПЛА-ДТ-направленные и ПЛА-ДТ-ПАВ с внесенными HDF (А, Б, В) и UC–MSC (А’’, Б’’, В’’).

Гистологический анализ зоны имплантации матрикса ПЛА-ДТ с фибробластами на 7-е сутки (рисунок 65 А) выявил элементы полимерного носителя в виде извилистых волокнисто-пластинчатых структур, окруженных клеточно-волокнуистой тканью. По периферии матрикса и в межволоконных пространствах отмечалась выраженная, но неравномерная клеточная инфильтрация с присутствием веретеновидных клеточных элементов, а в прилежащей ткани и в непосредственной близости от носителя выявлялись многочисленные кровенаполненные сосудистые профили различного калибра, что указывает на васкуляризацию области имплантации. Совокупность этих признаков соответствует интеграции конструкции с

ХАМ, клеточной колонизации матрикса и развитию умеренно выраженной воспалительно-репаративной реакции.

Иная динамика прослеживалась в той же группе матриксов при использовании UC–MSC (рисунок 65 А’): в зоне конструкции выявлялась выраженная клеточно-сосудистая реакция, при которой гиперцеллюлярные участки сочетались с формированием рыхлой клеточно-волокнуистой ткани, содержащей многочисленные кровенаполненные сосудистые профили преимущественно малого калибра. Такая морфологическая картина соответствовала активной интеграции матрикса и развитию васкуляризованной грануляционной ткани. При сопоставлении с матриксом, содержащим фибробласты, реакция при использовании UC–MSC носила более диффузный характер, тогда как в варианте с фибробластами более отчетливо определялся организованный веретенноклеточный компонент.

Переходя к направленным матриксам, стоит отметить, что после имплантации ПЛА-ДТ с ориентированными волокнами и внесенными фибробластами сохранялась преимущественно параллельная ориентация волокон и межволоконных пространств. Внутри и по периферии носителя определялась выраженная клеточная инфильтрация, причем веретеновидные клетки и формирующиеся клеточно-волокнуистые структуры местами располагались вдоль продольной оси волокон, что указывает на направляющее влияние анизотропной архитектуры матрикса на адгезию и миграцию клеток. Наряду с этим выявлялись отдельные сосудистые профили, свидетельствующие о васкуляризации зоны имплантации, а общая морфологическая картина соответствовала интеграции матрикса с тканями ХАМ и формированию ориентированной соединительной ткани без признаков обширного некроза.

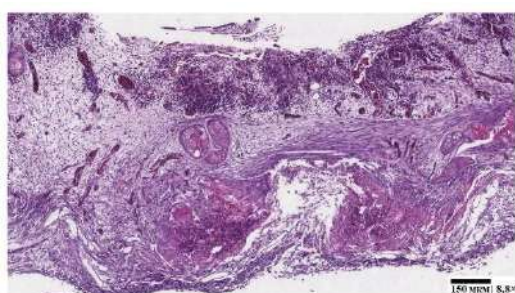
Комбинация того же направленного матрикса с UC–MSC давала заметно более неоднородный результат: плотные гиперцеллюлярные участки сочетались с рыхлой клеточно-волокнуистой тканью, содержащей многочисленные мелкие кровенаполненные сосудистые профили, а в отдельных зонах отмечалось преимущественно однонаправленное расположение клеточных и волокнуистых структур, что может отражать контактно-направляемую миграцию клеток вдоль ориентированных волокон носителя. По сравнению с аналогичным направленным матриксом с фибробластами в исследованных срезах конструкций с UC–MSC визуально наблюдалось большее количество мелких кровенаполненных сосудистых профилей; данное сравнение носит качественный характер.

Совершенно иная картина наблюдалась в группе матриксов с ПАВ. При имплантации ПЛА-ДТ-ПАВ с фибробластами материал сохранял преимущественно однородную эозинофильную структуру, а клеточная инфильтрация была слабой и неравномерной, локализуясь главным образом по периферии матрикса без выраженного проникновения клеток в его толщу; кровенаполненные сосудистые профили внутри конструкции практически не

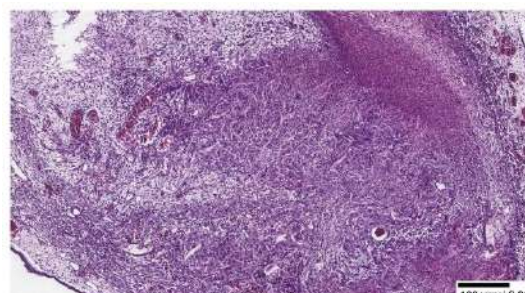
определялись, что указывает на отсутствие выраженного ангиогенного ответа в исследованном поле.

Неблагоприятный клеточный и тканевой ответ наблюдался для ПАВ-содержащего состава ПЛА-ДТ-ПАВ. Полученные данные демонстрируют ассоциацию данного состава с уменьшенной клеточной колонизацией и измененной сосудистой реакцией, но не позволяют установить, связан ли эффект непосредственно с остаточным ПАВ или с другими вызванными им изменениями структуры и поверхностных свойств матрикса.

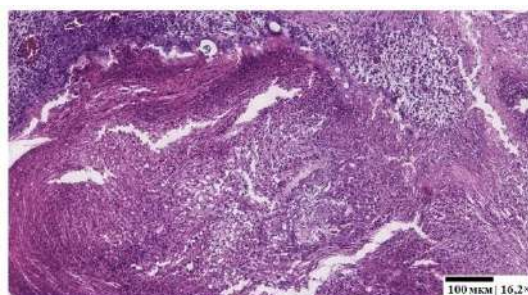
А



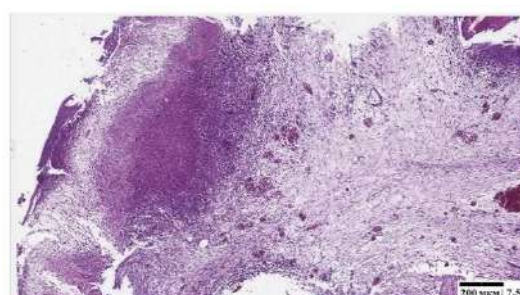
А''



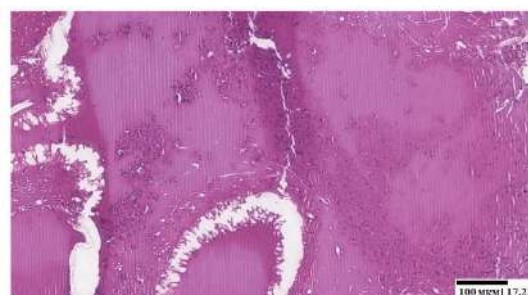
Б



Б''



В



В''

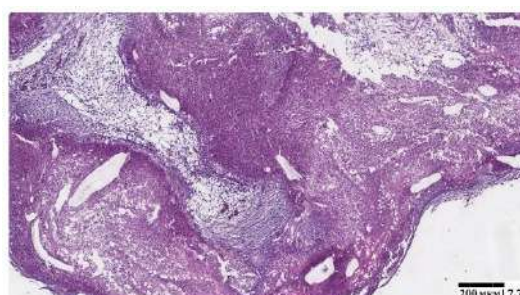


Рисунок 65 – Изображения гистологических срезов зон имплантации ПЛА-матрикса с клеточной культурой HDF и UC–MSC в хориоалантоисной мембране куриных эмбрионов на 7 день: ПЛА-ДТ (А–HDF, А''–UC–MSC), ПЛА-ДТ–направленные (Б–HDF, Б''–UC–MSC) и ПЛА-ДТ–ПАВ (В–HDF, В''–UC–MSC).

3.11.6 Выводы по главе 3.11

Исследование клеточно-матричных конструкций на модели ХАМ показало выраженные различия тканевого и сосудистого ответа в зависимости от типа матрикса и внесенной клеточной культуры. Для конструкций на основе ПЛА-ДТ и ориентированного ПЛА-ДТ макроскопически наблюдались плотный контакт с мембраной и конвергенция сосудов к зоне имплантации. СЭМ- и гистологический анализ выявил клеточно-фибрилярное покрытие, инфильтрацию клеточных элементов и кровенаполненные сосудистые профили в области контакта матрикса с тканью ХАМ.

В ориентированных ПЛА-ДТ-матриксах местами сохранялось преимущественное расположение клеточно-волоконистых структур вдоль направления волокон, что согласуется с наблюдаемым *in vitro* эффектом контактного ориентирования. В конструкциях с UC-MSC сосудистая и клеточная реакция качественно выглядела более диффузной, чем в соответствующих конструкциях с HDF; однако количественное сравнение сосудистой плотности между этими группами в настоящей работе не проводилось.

Для ПЛА-ДТ-ПАВ в обеих клеточных сериях наблюдалась менее выраженная колонизация матрикса и отсутствие убедительных морфологических признаков устойчивого сосудистого врастания в его толщу. В группе с UC-MSC дополнительно выявлялись участки неоднородной сосудистой реакции и геморрагического пропитывания. Совокупность результатов *in vitro* и ХАМ-эксперимента указывает на менее благоприятный биологический ответ на ПАВ-содержащий состав и необходимость дальнейшей оптимизации его состава и обработки.

В целом полученные данные подтверждают перспективность ПЛА-ДТ как основы для дальнейшего исследования волоконистых тканеинженерных конструкций и демонстрируют возможность управления пространственной организацией клеток посредством направленной архитектуры волокон.

Заключение

В работе проведено комплексное физико-химическое исследование электроформованных волокнистых матриц на основе полилактида с целью установления взаимосвязей между составом формуемой системы, морфологией и структурной организацией волокон, механическими свойствами, устойчивостью материала к воздействию модельных сред и клеточным ответом. Особое внимание уделено бинарной системе растворителей ДХМ–ТГФ 8:2 об./об. (ДТ), использованной для получения пористых ПЛА-матриц, их модификации поверхностно-активным веществом и гиалуронатом натрия, а также для формирования ориентированных волокнистых структур.

Установлено, что природа системы растворителей существенно влияет на морфологию электроформованных ПЛА-волокон. Использование ГФИП приводит преимущественно к формированию гладких волокон меньшего диаметра, тогда как система ДТ обеспечивает образование более крупных волокон с развитой поверхностной пористостью. Таким образом, изменение состава системы растворителей позволяет направленно регулировать морфологию волокнистого матрикса.

Показано, что влияние поверхностно-активного вещества зависит от состава формуемой системы. В системе ПЛА–ГФИП введение ПАВ сопровождается уменьшением среднего диаметра волокон и снижением механических характеристик. В системе ПЛА–ДТ присутствие ПАВ без гиалуроната натрия не приводит к заметному уменьшению диаметра волокон, но сопровождается резким снижением прочности и жесткости материала и повышенной потерей массы при инкубации в PBS и растворе Фентона. Введение гиалуроната натрия в систему ПЛА–ДТ существенно изменяет морфологию волокон и приводит к уменьшению их среднего диаметра.

Наиболее выраженное изменение механического поведения наблюдалось для состава ПЛА–ДТ–ГН-10%–ПАВ. По сравнению с ПЛА–ДТ–ГН-10% введение ПАВ сопровождалось значительным увеличением предела прочности, предела упругости и модуля Юнга. Направление этого эффекта противоположно действию ПАВ в системах без гиалуроната натрия и указывает на существенное изменение структурной организации многокомпонентного матрикса. Вместе с тем прямые данные о пространственном распределении компонентов и характере межфазного взаимодействия отсутствуют, поэтому механизм наблюдаемого упрочнения требует дальнейшего исследования. Повышение содержания гиалуроната натрия до 20 об.% сопровождалось общим снижением механических характеристик независимо от присутствия ПАВ.

Исследование стабильности матриц в модельных средах показало, что состав формуемой системы существенно влияет на кинетику потери массы. Наиболее выраженная потеря массы наблюдалась для ПЛА–ДТ–ПАВ: к 40-м суткам она достигала максимальных значений среди исследованных составов как в PBS, так и в растворе Фентона. Введение

гиалуроната натрия изменяло влияние ПАВ на стабильность многокомпонентного материала и сопровождалось существенно меньшей потерей массы по сравнению с ПЛА–ДТ–ПАВ. При этом измеренная потеря массы отражает суммарное изменение многокомпонентного матрикса и не может непосредственно рассматриваться как количественная характеристика скорости деградации цепей ПЛА или скорости *in vivo* резорбции.

Исследованы три подхода к формированию ориентированных ПЛА-матрикса: электроформование с использованием параллельных проводящих элементов коллектора, электроформование в присутствии постоянного магнитного поля и постформовочная одноосная вытяжка в этаноле. Для первых двух подходов коэффициент когерентности волокон составил 0,70 и 0,76 соответственно, что подтверждает возможность получения выражено анизотропных волокнистых структур непосредственно в процессе электроформования.

Постформовочная вытяжка в этаноле обеспечивала выраженную переориентацию волокон и сопровождалась уменьшением их среднего диаметра. Предварительная вакуумная сушка существенно влияла на характер деформации: свежесформованные матриксы в целом деформировались более однородно и с меньшим числом видимых морфологических дефектов, чем предварительно высушенные. Наиболее выраженное влияние остаточного растворителя выявлено для ПЛА–ГФИП. Свежеэлектроформованный материал характеризовался пониженной температурой стеклования $T_g=46,04$ °C и наличием фтора по данным ЭДС, тогда как после вакуумной сушки T_g возрастала приблизительно до 60 °C, а содержание F существенно снижалось. После вытяжки в этаноле F находился ниже предела обнаружения ЭДС. Совокупность ДСК- и ЭДС-данных согласуется с пластифицирующим влиянием остаточного фторсодержащего растворителя на аморфную фазу ПЛА.

Мало- и широкоугловое рентгеновское рассеяние показало, что постформовочная вытяжка формирует структурную анизотропию на различных масштабных уровнях. На мезоскопическом уровне, исследуемом методом МУРР, после вытяжки наблюдалось выраженное увеличение параметра ориентации, тогда как анизотропия аморфного БУРР-ореола оставалась относительно слабой. Таким образом, механическая вытяжка значительно эффективнее ориентирует волокнистую и мезомасштабную структуру матрикса, чем аморфные цепные сегменты на молекулярном уровне.

Исследования *in vitro* показали, что матриксы ПЛА–ДТ поддерживают заселение HDF и UC–MSC, а ориентированная архитектура волокон задает преимущественное направление расположения клеток. Для HDF на ориентированных матриксах наблюдалась более высокая клеточная плотность в исследованных полях зрения, тогда как для UC–MSC основной эффект ориентации проявлялся в изменении клеточной морфологии и направления роста. ПАВ-содержащий состав ПЛА–ДТ–ПАВ характеризовался значительно меньшей плотностью

клеточного заселения для обеих культур, что указывает на менее благоприятный клеточный ответ, однако представленные данные не позволяют однозначно разграничить вклад адгезии, сохранности клеток и возможного цитотоксического действия ПАВ.

Исследование клеточно-матриксных конструкций на модели хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона выявило плотный контакт ПЛА–ДТ и ориентированных ПЛА–ДТ-матрикс с тканью ХАМ, клеточную инфильтрацию и наличие кровенаполненных сосудистых профилей в зоне имплантации. В ориентированных матриксах местами сохранялось преимущественное расположение клеточно-волоконистых структур вдоль направления волокон. Для ПЛА–ДТ–ПАВ наблюдались менее выраженная клеточная колонизация и более неоднородная сосудистая реакция, что согласуется с результатами *in vitro* и указывает на необходимость дальнейшей оптимизации ПАВ-содержащих составов.

Разработанная система растворителей ДТ защищена патентом Российской Федерации № RU 2858656 и может быть использована как технологическая основа для получения пористых и ориентированных ПЛА-матрикс с регулируемыми морфологическими, механическими и деградационными характеристиками. Матрикс ПЛА–ДТ представляют интерес для дальнейших исследований в качестве основы тканеинженерных конструкций. Состав ПЛА–ДТ–ГН-10%–ПАВ выделяется сочетанием механических характеристик и особенностей поведения в модельных средах, однако перед рассмотрением его для доклинических исследований требуется самостоятельная биологическая верификация.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному руководителю Д. А. Иванову и наставнику Д. В. Клинову за неоценимую помощь и поддержку на всех этапах выполнения диссертационной работы: при постановке исследовательских задач и проведении экспериментов, освоении новых экспериментальных методов, а также подготовке и публикации результатов исследований. Автор благодарит коллег и соавторов Г. Г. Агеева, А. А. Пирязева, С. А. Тлимахову, Е. Д. Сяглову, В. С. Штоль, Е. Н. Субчеву, Д. В. Анохина за плодотворную совместную экспериментальную работу, без которой выполнение данной диссертации было бы невозможно. Автор искренне признательна И. В. Холоденко, А. А. Голубевой и всему коллективу лаборатории клеточной биологии ИБМХ им. В. Н. Ореховича за идеи, консультации и плодотворные дискуссии при планировании и реализации биологических экспериментов.

Список сокращений и условных обозначений

- ГН – гиалуронат натрия
- ГФИП – гексафторизопропанол
- ДМФ – N,N-диметилформамид
- ДТ – соотношение ДХМ/ТГФ 8:2 об./об.
- ДХМ – дихлорметан
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ПАВ – поверхностно-активное вещество
- ПБС (PBS) – фосфатно-солевой буферный раствор
- ПЛА (PLA) – полилактид / полимолочная кислота
- ПЛГА (PLGA) – поли(лактид-со-гликолид)
- ПАН (PAN) – полиакрилонитрил
- ПГА (PGA) – полигликолид
- ПКЛ (PCL) – поли(ε-капролактон)
- ПНА (PHA) – полигидроксиалканоаты
- ПУ (PU) – полиуретан
- СЭМ (SEM) – сканирующая электронная микроскопия
- ХАМ – хорионаллантоисная мембрана
- ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия
- ЭФ – электроформование
- ДСК (DSC) – дифференциальная сканирующая калориметрия
- ЕСМ – внеклеточный матрикс
- HDF – фибробласты дермы человека (human dermal fibroblasts)
- МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние (small-angle X-ray scattering)
- STEM – просвечивающая сканирующая электронная микроскопия (scanning transmission electron microscopy)
- UC-MSC – мезенхимальные стромальные клетки пуповины человека (umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells)
- БУРР – широкоугловое рентгеновское рассеяние (wide-angle X-ray scattering)
- XRD – рентгеновская дифракция (X-ray diffraction)
- Обозначения составов матриксов
- ПЛА-ГФИП – матрикс из полилактида, сформированный из раствора в ГФИП
- ПЛА-ГФИП-ПАВ – ПЛА-матрикс, сформированный из раствора в ГФИП с добавлением ПАВ
- ПЛА-ДТ – ПЛА-матрикс, сформированный из разработанной системы растворителей ДТ

ПЛА-ДТ-ПАВ – ПЛА-матрикс, сформированный из системы ДТ с добавлением ПАВ

ПЛА-ДТ-ГН-10% – ПЛА-матрикс из системы ДТ, содержащий 10% гиалуроната натрия

ПЛА-ДТ-ГН-10%-ПАВ – ПЛА-матрикс из системы ДТ, содержащий 10% гиалуроната натрия и ПАВ

ПЛА-ДТ-ГН-20% – ПЛА-матрикс из системы ДТ, содержащий 20% гиалуроната натрия

ПЛА-ДТ-ГН-20%-ПАВ – ПЛА-матрикс из системы ДТ, содержащий 20% гиалуроната натрия и ПАВ

ПЛА-ДТ-высушенные – предварительно высушенный ПЛА-матрикс, полученный из системы ДТ

Список литературы

1. Wendler D., Schmidt W. [Teratological study of talinolol (Cordanum, 02-115)] // Pharmazie. 1975. Т. 30, № 10. С. 669–661.
2. Liu Y. и др. A review on recent advances in application of electrospun nanofiber materials as biosensors // Current Opinion in Biomedical Engineering. 2020. Т. 13. С. 174–189.
3. Ding H. и др. Application of electrospun nanofibers in bone, cartilage and osteochondral tissue engineering // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2021. Т. 32, № 4. С. 536–561.
4. Chinatangkul N., Limmatvapirat C., Limmatvapirat S. Electrospun nanofibers from natural polymers and their application.
5. Mulholland E. J. Electrospun Biomaterials in the Treatment and Prevention of Scars in Skin Wound Healing // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. Т. 8. С. 481.
6. Kretov E. I. и др. Electrospinning for the design of medical supplies // Bùll. sib. med. 2020. Т. 19, № 2. С. 153–162.
7. You Y. и др. *In vitro* degradation behavior of electrospun polyglycolide, polylactide, and poly(lactide- co -glycolide) // J of Applied Polymer Sci. 2005. Т. 95, № 2. С. 193–200.
8. Yoshimoto H. и др. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering // Biomaterials. 2003. Т. 24, № 12. С. 2077–2082.
9. Gabriel L. P. и др. Electrospun polyurethane membranes for Tissue Engineering applications // Materials Science and Engineering: C. 2017. Т. 72. С. 113–117.
10. Jaganathan S. K. и др. Biomimetic electrospun polyurethane matrix composites with tailor made properties for bone tissue engineering scaffolds // Polymer Testing. 2019. Т. 78. С. 105955.
11. Rahmati M. и др. Electrospinning for tissue engineering applications // Progress in Materials Science. 2021. Т. 117. С. 100721.
12. Sell S. A. и др. The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues // Polymers. 2010. Т. 2, № 4. С. 522–553.
13. Şimşek M. Tuning surface texture of electrospun polycaprolactone fibers: Effects of solvent systems and relative humidity // J. Mater. Res. 2020. Т. 35, № 3. С. 332–342.
14. Nam J. и др. Improved Cellular Infiltration in Electrospun Fiber via Engineered Porosity // Tissue Engineering. 2007. Т. 13, № 9. С. 2249–2257.
15. Huang W.-Y., Suye S., Fujita S. Cell Trapping via Migratory Inhibition within Density-Tuned Electrospun Nanofibers // ACS Appl. Bio Mater. 2021. Т. 4, № 10. С. 7456–7466.
16. Lannutti J. и др. Electrospinning for tissue engineering scaffolds // Materials Science and Engineering: C. 2007. Т. 27, № 3. С. 504–509.

17. Sill T. J., Von Recum H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering // *Biomaterials*. 2008. T. 29, № 13. C. 1989–2006.
18. Pant B., Park M., Park S.-J. Drug Delivery Applications of Core-Sheath Nanofibers Prepared by Coaxial Electrospinning: A Review // *Pharmaceutics*. 2019. T. 11, № 7. C. 305.
19. Sawicka K., Gouma P., Simon S. Electrospun biocomposite nanofibers for urea biosensing // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2005. T. 108, № 1–2. C. 585–588.
20. Halicka K., Cabaj J. Electrospun Nanofibers for Sensing and Biosensing Applications—A Review // *IJMS*. 2021. T. 22, № 12. C. 6357.
21. Zhao G. и др. Recent Advances in Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering // *Adv Funct Materials*. 2015. T. 25, № 36. C. 5726–5738.
22. Nguyen T.-H. и др. A novel fibrous scaffold composed of electrospun porous poly(ϵ -caprolactone) fibers for bone tissue engineering // *J Biomater Appl*. 2013. T. 28, № 4. C. 514–528.
23. Abrigo M., McArthur S. L., Kingshott P. Electrospun Nanofibers as Dressings for Chronic Wound Care: Advances, Challenges, and Future Prospects // *Macromolecular Bioscience*. 2014. T. 14, № 6. C. 772–792.
24. Reyes C. G., Lagerwall J. P. F. Disruption of Electrospinning due to Water Condensation into the Taylor Cone // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2020. T. 12, № 23. C. 26566–26576.
25. Scheideler W. J., Chen C.-H. The minimum flow rate scaling of Taylor cone-jets issued from a nozzle // *Appl. Phys. Lett*. 2014. T. 104, № 2. C. 024103.
26. Suresh S., Becker A., Glasmacher B. Impact of Apparatus Orientation and Gravity in Electrospinning—A Review of Empirical Evidence // *Polymers*. 2020. T. 12, № 11. C. 2448.
27. Waqas Munir M., Ali U. Classification of Electrospinning Methods // *Nanorods and Nanocomposites* / под ред. Sasani Ghamsari M., Dhara S. IntechOpen, 2020.
28. Alghoraibi I., Alomari S. Different Methods for Nanofiber Design and Fabrication // *Handbook of Nanofibers* / под ред. Barhoum A., Bechelany M., Makhoulf A. Cham: Springer International Publishing, 2018. C. 1–46.
29. Tsareva A. D. и др. Electrospinning for Biomedical Applications: An Overview of Material Fabrication Techniques // *Surfaces*. 2025. T. 8, № 1. C. 7.
30. Maleki M. и др. Electrospun core-shell nanofibers for drug encapsulation and sustained release // *Polymer Engineering & Sci*. 2013. T. 53, № 8. C. 1770–1779.
31. Voniatis C. и др. Enhancing critical features of poly(amino acid) based meshes // *J of Applied Polymer Sci*. 2022. T. 139, № 15. C. 51933.
32. Sheikhi S. и др. Comparison of the mechanical characteristics of produced nanofibers by electrospinning process based on different collectors // *Heliyon*. 2024. T. 10, № 1. C. e23841.

33. Alfaro De Prá M. A. и др. Effect of collector design on the morphological properties of polycaprolactone electrospun fibers // *Materials Letters*. 2017. Т. 193. С. 154–157.
34. Ramakrishna S. и др. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. WORLD SCIENTIFIC, 2005.
35. Ojha S. S. и др. Morphology of electrospun nylon-6 nanofibers as a function of molecular weight and processing parameters // *J of Applied Polymer Sci*. 2008. Т. 108, № 1. С. 308–319.
36. Fong H., Chun I., Reneker D. H. Beaded nanofibers formed during electrospinning // *Polymer*. 1999. Т. 40, № 16. С. 4585–4592.
37. Liu L.-G., He J.-H. Solvent evaporation in a binary solvent system for controllable fabrication of porous fibers by electrospinning // *Therm sci*. 2017. Т. 21, № 4. С. 1821–1825.
38. Ura D. P., Stachewicz U. The Significance of Electrical Polarity in Electrospinning: A Nanoscale Approach for the Enhancement of the Polymer Fibers' Properties // *Macro Materials & Eng*. 2022. Т. 307, № 5. С. 2100843.
39. Ying Yang и др. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polyethylene oxide solution // *IEEE Trans. Dielect. Electr. Insul*. 2006. Т. 13, № 3. С. 580–585.
40. Kao K.-C. *Dielectric phenomena in solids: with emphasis on physical concepts of electronic processes*. Amsterdam ; Boston: Academic Press, 2004. 1 с.
41. Angamma C. J., Jayaram S. H. Analysis of the Effects of Solution Conductivity on Electrospinning Process and Fiber Morphology // *IEEE Trans. on Ind. Applicat*. 2011. Т. 47, № 3. С. 1109–1117.
42. Luo C. J., Stride E., Edirisinghe M. Mapping the Influence of Solubility and Dielectric Constant on Electrospinning Polycaprolactone Solutions // *Macromolecules*. 2012. Т. 45, № 11. С. 4669–4680.
43. You Y. и др. Effect of solution properties on nanofibrous structure of electrospun poly(lactic- co -glycolic acid) // *J of Applied Polymer Sci*. 2006. Т. 99, № 3. С. 1214–1221.
44. Sun Z. и др. The effect of solvent dielectric properties on the collection of oriented electrospun fibers // *J of Applied Polymer Sci*. 2012. Т. 125, № 4. С. 2585–2594.
45. Tan S.-H. и др. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process // *Polymer*. 2005. Т. 46, № 16. С. 6128–6134.
46. Wu C. и др. Effects of electrostatic polarity and the types of electrical charging on electrospinning behavior // *J of Applied Polymer Sci*. 2012. Т. 126, № S2.
47. Liu Z. и др. Electrospun Jets Number and Nanofiber Morphology Effected by Voltage Value: Numerical Simulation and Experimental Verification // *Nanoscale Res Lett*. 2019. Т. 14, № 1. С. 310.

48. Xue J. и др. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications // Chem. Rev. 2019. Т. 119, № 8. С. 5298–5415.
49. Tang X.-P. и др. Effect of flow rate on diameter of electrospun nanoporous fibers // Therm sci. 2014. Т. 18, № 5. С. 1447–1449.
50. Zargham S. и др. The Effect of Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6 Nanofiber // Journal of Engineered Fibers and Fabrics. 2012. Т. 7, № 4. С. 155892501200700414.
51. He H., Kara Y., Molnar K. Effect of needle characteristic on fibrous PEO produced by electrospinning // Resolution and Discovery. 2019. Т. 4, № 1. С. 7–11.
52. Rogina A. Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery // Applied Surface Science. 2014. Т. 296. С. 221–230.
53. Pelipenko J., Kocbek P., Kristl J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration // International Journal of Pharmaceutics. 2015. Т. 484, № 1–2. С. 57–74.
54. Tripatanasuwan S., Zhong Z., Reneker D. H. Effect of evaporation and solidification of the charged jet in electrospinning of poly(ethylene oxide) aqueous solution // Polymer. 2007. Т. 48, № 19. С. 5742–5746.
55. Mailley D., Hébraud A., Schlatter G. A Review on the Impact of Humidity during Electrospinning: From the Nanofiber Structure Engineering to the Applications // Macro Materials & Eng. 2021. Т. 306, № 7. С. 2100115.
56. Nezarati R. M., Eifert M. B., Cosgriff-Hernandez E. Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology // Tissue Engineering Part C: Methods. 2013. Т. 19, № 10. С. 810–819.
57. Mit-uppatham C., Nithitanakul M., Supaphol P. Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter // Macro Chemistry & Physics. 2004. Т. 205, № 17. С. 2327–2338.
58. De Vrieze S. и др. The effect of temperature and humidity on electrospinning // J Mater Sci. 2009. Т. 44, № 5. С. 1357–1362.
59. Yang G.-Z. и др. Influence of Working Temperature on The Formation of Electrospun Polymer Nanofibers // Nanoscale Res Lett. 2017. Т. 12, № 1. С. 55.
60. Collins G. и др. Charge generation, charge transport, and residual charge in the electrospinning of polymers: A review of issues and complications // Journal of Applied Physics. 2012. Т. 111, № 4. С. 044701.

61. Reneker D. H. и др. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning // *Journal of Applied Physics*. 2000. Т. 87, № 9. С. 4531–4547.
62. Uhljar L. É., Ambrus R. Electrospinning of Potential Medical Devices (Wound Dressings, Tissue Engineering Scaffolds, Face Masks) and Their Regulatory Approach // *Pharmaceutics*. 2023. Т. 15, № 2. С. 417.
63. Reneker D. H., Yarin A. L. Electrospinning jets and polymer nanofibers // *Polymer*. 2008. Т. 49, № 10. С. 2387–2425.
64. Shenoy S. L. и др. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer–polymer interaction limit // *Polymer*. 2005. Т. 46, № 10. С. 3372–3384.
65. Han D., Steckl A. J. Coaxial Electrospinning Formation of Complex Polymer Fibers and their Applications // *ChemPlusChem*. 2019. Т. 84, № 10. С. 1453–1497.
66. He J.-H., Wu Y., Zuo W.-W. Critical length of straight jet in electrospinning // *Polymer*. 2005. Т. 46, № 26. С. 12637–12640.
67. Focarete M. L., Tampieri A. Core-shell nanostructures for drug delivery and theranostics: challenges, strategies and prospects for novel carrier systems. Duxford: Woodhead publishing, 2018.
68. Cornejo Bravo J. M., Villarreal Gómez L. J., Serrano Medina A. Electrospinning for Drug Delivery Systems: Drug Incorporation Techniques // *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications* / под ред. Haider S., Haider A. InTech, 2016.
69. Voniatis C. и др. Synergistic properties of polysuccinimide/poly(lactic acid) co-electrospun and blended-electrospun nanofibers // *Journal of Molecular Liquids*. 2023. Т. 390. С. 123150.
70. Dayan C. B. и др. Modeling 3D melt electrospinning writing by response surface methodology // *Materials & Design*. 2018. Т. 148. С. 87–95.
71. Zhang L.-H. и др. Recent advances in melt electrospinning // *RSC Adv*. 2016. Т. 6, № 58. С. 53400–53414.
72. Brown T. D., Dalton P. D., Hutmacher D. W. Melt electrospinning today: An opportune time for an emerging polymer process // *Progress in Polymer Science*. 2016. Т. 56. С. 116–166.
73. Bachs-Herrera A. и др. Melt Electrospinning of Polymers: Blends, Nanocomposites, Additives and Applications // *Applied Sciences*. 2021. Т. 11, № 4. С. 1808.
74. Li X. и др. Preparation and properties of PET/SiO₂ composite micro/nanofibers by a laser melt-electrospinning system // *J of Applied Polymer Sci*. 2012. Т. 125, № 3. С. 2050–2055.
75. Hengsawas Surasarang S. и др. Hot melt extrusion versus spray drying: hot melt extrusion degrades albendazole // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017. Т. 43, № 5. С. 797–811.

76. Hewitt E. и др. Melt-electrowriting with novel milk protein/PCL biomaterials for skin regeneration // *Biomed. Mater.* 2019. Т. 14, № 5. С. 055013.
77. Hutmacher D. W., Dalton P. D. Melt Electrospinning // *Chemistry An Asian Journal*. 2011. Т. 6, № 1. С. 44–56.
78. Vlachou M., Siamidi A., Kyriakou S. Electrospinning and Drug Delivery // *Electrospinning and Electrospraying - Techniques and Applications* / под ред. Haider S., Haider A. IntechOpen, 2019.
79. Suganya S. и др. Herbal drug incorporated antibacterial nanofibrous mat fabricated by electrospinning: An excellent matrix for wound dressings // *J of Applied Polymer Sci.* 2011. Т. 121, № 5. С. 2893–2899.
80. Liu H. и др. Recent Progress of Electrospun Herbal Medicine Nanofibers // *Biomolecules*. 2023. Т. 13, № 1. С. 184.
81. Ji Y. и др. A Review on Electrospun Poly(amino acid) Nanofibers and Their Applications of Hemostasis and Wound Healing // *Biomolecules*. 2022. Т. 12, № 6. С. 794.
82. El-Aassar M. R. и др. Wound healing of nanofiber comprising Polygalacturonic/Hyaluronic acid embedded silver nanoparticles: In-vitro and in-vivo studies // *Carbohydrate Polymers*. 2020. Т. 238. С. 116175.
83. Zehetmeyer G. и др. Biodegradable and antimicrobial films based on poly(butylene adipate-co-terephthalate) electrospun fibers // *Polym. Bull.* 2017. Т. 74, № 8. С. 3243–3268.
84. Dias F. T. G. и др. The main blow spun polymer systems: processing conditions and applications // *J Polym Res.* 2020. Т. 27, № 8. С. 205.
85. Heseltine P. L. и др. Fiber Formation from Silk Fibroin Using Pressurized Gyration // *Macro Materials & Eng.* 2019. Т. 304, № 1. С. 1800577.
86. Sun Z. и др. Compound Core–Shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning // *Advanced Materials*. 2003. Т. 15, № 22. С. 1929–1932.
87. Chen R. и др. Preparation and characterization of coaxial electrospun thermoplastic polyurethane/collagen compound nanofibers for tissue engineering applications // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010. Т. 79, № 2. С. 315–325.
88. Khalf A., Madihally S. V. Recent advances in multi-axial electrospinning for drug delivery // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017. Т. 112. С. 1–17.
89. Avossa J. и др. Electrospinning based on benign solvents: current definitions, implications and strategies // *Green Chem.* 2022. Т. 24, № 6. С. 2347–2375.
90. Zhang J. X. и др. Optimizing double emulsion process to decrease the burst release of protein from biodegradable polymer microspheres // *Journal of Microencapsulation*. 2005. Т. 22, № 4. С. 413–422.

91. Chew S. Y. и др. The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation // *Biomaterials*. 2008. Т. 29, № 6. С. 653–661.
92. Jia Y. и др. Nanofiber arrangement regulates peripheral nerve regeneration through differential modulation of macrophage phenotypes // *Acta Biomaterialia*. 2019. Т. 83. С. 291–301.
93. Robinson A. J. и др. Comparative analysis of fiber alignment methods in electrospinning // *Matter*. 2021. Т. 4, № 3. С. 821–844.
94. Meinhold K. L. и др. Mandrel Diameter is a Dominating Parameter for Fiber Alignment Control in Rotating Mandrel Electrospinning Systems. *Bioengineering*, 2024.
95. Maurya A. K. и др. Understanding multiscale structure–property correlations in PVDF-HFP electrospun fiber membranes by SAXS and WAXS // *Nanoscale Adv.* 2022. Т. 4, № 2. С. 491–501.
96. Li P. и др. Influence of Fe₃ O₄ Nanoparticles on the Preparation of Aligned PLGA Electrospun Fibers Induced by Magnetic Field // *Journal of Nanomaterials* / под ред. Li X. 2013. Т. 2013, № 1. С. 483569.
97. Zhao J., Liu H., Xu L. Preparation and formation mechanism of highly aligned electrospun nanofibers using a modified parallel electrode method // *Materials & Design*. 2016. Т. 90. С. 1–6.
98. İçoğlu H. İ. и др. Production of aligned electrospun polyvinyl alcohol nanofibers via parallel electrode method // *The Journal of The Textile Institute*. 2021. Т. 112, № 6. С. 936–945.
99. Lei T. и др. New Insight into Gap Electrospinning: Toward Meter-long Aligned Nanofibers // *Langmuir*. 2018. Т. 34, № 45. С. 13788–13793.
100. Pavlova E. R. и др. Tuning the properties of electrospun polylactide mats by ethanol treatment // *Materials & Design*. 2019. Т. 181. С. 108061.
101. Trofimchuk E. S. и др. Cold Crystallization of Glassy Polylactide during Solvent Crazing // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017. Т. 9, № 39. С. 34325–34336.
102. Udayakumar M. и др. Temperature and Time Dependence of the Solvent-Induced Crystallization of Poly(l-lactide) // *Polymers*. 2020. Т. 12, № 5. С. 1065.
103. Echeverría C. и др. Development of Highly Crystalline Polylactic Acid with β-Crystalline Phase from the Induced Alignment of Electrospun Fibers // *Polymers*. 2021. Т. 13, № 17. С. 2860.
104. Huang Z.-M. и др. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites // *Composites Science and Technology*. 2003. Т. 63, № 15. С. 2223–2253.
105. Nawinda Chinatangkul C. L. Electrospun nanofibers from natural polymers and their application // *Science. Silpakorn University Research Innovation and Creativity Administration Office*, 2021. Т. Engineering and Health Studies. С. 21010005.

106. Wray L. S. и др. Effect of processing on silk-based biomaterials: Reproducibility and biocompatibility // *J Biomed Mater Res*. 2011. Т. 99B, № 1. С. 89–101.
107. Zhang X., Baughman C. B., Kaplan D. L. In vitro evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds for vascular cell growth // *Biomaterials*. 2008. Т. 29, № 14. С. 2217–2227.
108. Zhou J. и др. Electrospinning of silk fibroin and collagen for vascular tissue engineering // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010. Т. 47, № 4. С. 514–519.
109. Wang D., Liu H., Fan Y. Silk fibroin for vascular regeneration // *Microscopy Res & Technique*. 2017. Т. 80, № 3. С. 280–290.
110. Çalamak S. и др. Silk fibroin based antibacterial bionanotextiles as wound dressing materials // *Materials Science and Engineering: C*. 2014. Т. 43. С. 11–20.
111. Patil P. P., Reagan M. R., Bohara R. A. Silk fibroin and silk-based biomaterial derivatives for ideal wound dressings // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Т. 164. С. 4613–4627.
112. Choudhury A. J. и др. Controlled antibiotic-releasing *Antheraea assama* silk fibroin suture for infection prevention and fast wound healing // *Surgery*. 2016. Т. 159, № 2. С. 539–547.
113. Tuwalska A., Grabska-Zielińska S., Sionkowska A. Chitosan/Silk Fibroin Materials for Biomedical Applications—A Review // *Polymers*. 2022. Т. 14, № 7. С. 1343.
114. Yonesi M. и др. Silk Fibroin: An Ancient Material for Repairing the Injured Nervous System // *Pharmaceutics*. 2021. Т. 13, № 3. С. 429.
115. Farokhi M. и др. Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering // *Biotechnology Advances*. 2018. Т. 36, № 1. С. 68–91.
116. Khan R. S. и др. A comparative review on silk fibroin nanofibers encasing the silver nanoparticles as antimicrobial agents for wound healing applications // *Materials Today Communications*. 2022. Т. 32. С. 103914.
117. Phamornnak C. и др. Instructive electroactive electrospun silk fibroin-based biomaterials for peripheral nerve tissue engineering // *Biomaterials Advances*. 2022. Т. 141. С. 213094.
118. Shoulders M. D., Raines R. T. Collagen Structure and Stability // *Annu. Rev. Biochem.* 2009. Т. 78, № 1. С. 929–958.
119. Schmitt F. O. и др. THE ANTIGENICITY OF TROPOCOLLAGEN // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1964. Т. 51, № 3. С. 493–497.
120. Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications // *Materials*. 2010. Т. 3, № 3. С. 1863–1887.
121. Lynn A. K., Yannas I. V., Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen // *J Biomed Mater Res*. 2004. Т. 71B, № 2. С. 343–354.

122. Lee C. H., Singla A., Lee Y. Biomedical applications of collagen // *International Journal of Pharmaceutics*. 2001. T. 221, № 1–2. С. 1–22.
123. Rodrigues C. V. M. и др. Characterization of a bovine collagen–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering // *Biomaterials*. 2003. T. 24, № 27. С. 4987–4997.
124. Chen F., Yoo J. J., Atala A. Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair // *Urology*. 1999. T. 54, № 3. С. 407–410.
125. Chattopadhyay S., Raines R. T. Collagen-based biomaterials for wound healing // *Biopolymers*. 2014. T. 101, № 8. С. 821–833.
126. Doillon C. J. и др. Collagen-based wound dressings: Control of the pore structure and morphology // *J. Biomed. Mater. Res*. 1986. T. 20, № 8. С. 1219–1228.
127. Brett D. A Review of Collagen and Collagen-based Wound Dressings // *Wounds*. 2008. T. 20, № 12. С. 347–356.
128. Kon E. и др. Novel Nano-composite Multilayered Biomaterial for Osteochondral Regeneration: A Pilot Clinical Trial // *Am J Sports Med*. 2011. T. 39, № 6. С. 1180–1190.
129. Pankajakshan D. и др. Injectable Highly Tunable Oligomeric Collagen Matrices for Dental Tissue Regeneration // *ACS Appl. Bio Mater*. 2020. T. 3, № 2. С. 859–868.
130. García-Hernández A. и др. PVA-Based Electrospun Biomembranes with Hydrolyzed Collagen and Ethanolic Extract of *Hypericum perforatum* for Potential Use as Wound Dressing: Fabrication and Characterization // *Polymers*. 2022. T. 14, № 10. С. 1981.
131. Djagny K. B., Wang Z., Xu S. Gelatin: A Valuable Protein for Food and Pharmaceutical Industries: Review // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2001. T. 41, № 6. С. 481–492.
132. Elzoghby A. O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research // *Journal of Controlled Release*. 2013. T. 172, № 3. С. 1075–1091.
133. Echave M. C. и др. Progress of gelatin-based 3D approaches for bone regeneration // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017. T. 42. С. 63–74.
134. Yazdanpanah A. и др. Bioengineering of fibroblast-conditioned polycaprolactone/gelatin electrospun scaffold for skin tissue engineering // *Artificial Organs*. 2022. T. 46, № 6. С. 1040–1054.
135. Gautam S. и др. Gelatin-polycaprolactone-nanohydroxyapatite electrospun nanocomposite scaffold for bone tissue engineering // *Materials Science and Engineering: C*. 2021. T. 119. С. 111588.
136. Ahmadi S., Shafiei S. S., Sabouni F. Electrospun Nanofibrous Scaffolds of Polycaprolactone/Gelatin Reinforced with Layered Double Hydroxide Nanoclay for Nerve Tissue Engineering Applications // *ACS Omega*. 2022. T. 7, № 32. С. 28351–28360.
137. Wang J., Zhuang S. Chitosan-based materials: Preparation, modification and application // *Journal of Cleaner Production*. 2022. T. 355. С. 131825.

138. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications. 0 изд. / под ред. Kim S.-K. CRC Press, 2010.
139. Wang W. и др. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine // IJMS. 2020. Т. 21, № 2. С. 487.
140. Pavoni J. M. F., Luchese C. L., Tessaro I. C. Impact of acid type for chitosan dissolution on the characteristics and biodegradability of cornstarch/chitosan based films // International Journal of Biological Macromolecules. 2019. Т. 138. С. 693–703.
141. Kaczmarek B. и др. The film-forming properties of chitosan with tannic acid addition // Materials Letters. 2019. Т. 245. С. 22–24.
142. Kritchenkov A. S. и др. Novel non-toxic high efficient antibacterial azido chitosan derivatives with potential application in food coatings // Food Chemistry. 2019. Т. 301. С. 125247.
143. Balagangadharan K., Dhivya S., Selvamurugan N. Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering // International Journal of Biological Macromolecules. 2017. Т. 104. С. 1372–1382.
144. Islam Md. M. и др. Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications- A review // Bioactive Materials. 2020. Т. 5, № 1. С. 164–183.
145. Zhang X. и др. Silk fibroin microfibers and chitosan modified poly (glycerol sebacate) composite scaffolds for skin tissue engineering // Polymer Testing. 2017. Т. 62. С. 88–95.
146. Vishwanath V., Pramanik K., Biswas A. Optimization and evaluation of silk fibroin-chitosan freeze-dried porous scaffolds for cartilage tissue engineering application // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2016. Т. 27, № 7. С. 657–674.
147. Pezeshki-Modaress M., Zandi M., Rajabi S. Tailoring the gelatin/chitosan electrospun scaffold for application in skin tissue engineering: an in vitro study // Prog Biomater. 2018. Т. 7, № 3. С. 207–218.
148. Sahoo D. R., Biswal T. Alginate and its application to tissue engineering // SN Appl. Sci. 2021. Т. 3, № 1. С. 30.
149. Clementi F. Alginate Production by *Azotobacter Vinelandii* // Critical Reviews in Biotechnology. 1997. Т. 17, № 4. С. 327–361.
150. Govan J. R. W., Fyfe J. A. M., Jarman T. R. Isolation of Alginate-producing Mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina* // Microbiology. 1981. Т. 125, № 1. С. 217–220.
151. Wang W. и др. Synthesis of oxidized sodium alginate and its electrospun bio-hybrids with zinc oxide nanoparticles to promote wound healing // International Journal of Biological Macromolecules. 2023. Т. 232. С. 123480.

152. Hajiabbas M., Alemzadeh I., Vossoughi M. A porous hydrogel-electrospun composite scaffold made of oxidized alginate/gelatin/silk fibroin for tissue engineering application // *Carbohydrate Polymers*. 2020. T. 245. C. 116465.
153. Su C.-M. и др. Hyaluronic Acid-Based Biomaterials in Tissue Engineering: From Molecular Properties to Re-Generative Applications // *JFB*. 2026. T. 17, № 5. C. 246.
154. Chang W., Chen L., Chen K. The bioengineering application of hyaluronic acid in tissue regeneration and repair // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024. T. 270. C. 132454.
155. Chen H. и др. Molecular Interaction, Chain Conformation, and Rheological Modification during Electrospinning of Hyaluronic Acid Aqueous Solution // *Membranes*. 2020. T. 10, № 9. C. 217.
156. Naor D. Editorial: Interaction Between Hyaluronic Acid and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulates the Activity of Inflammation and Cancer // *Front. Immunol.* 2016. T. 7.
157. Kouvidi K. и др. Role of Receptor for Hyaluronic Acid-mediated Motility (RHAMM) in Low Molecular Weight Hyaluronan (LMWHA)-mediated Fibrosarcoma Cell Adhesion // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. T. 286, № 44. C. 38509–38520.
158. Misra S. и др. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer // *Front. Immunol.* 2015. T. 6.
159. Su S. и др. Coaxial and emulsion electrospinning of extracted hyaluronic acid and keratin based nanofibers for wound healing applications // *European Polymer Journal*. 2021. T. 142. C. 110158.
160. Lim L.-T., Auras R., Rubino M. Processing technologies for poly(lactic acid) // *Progress in Polymer Science*. 2008. T. 33, № 8. C. 820–852.
161. P. Pawar R. и др. Biomedical Applications of Poly(Lactic Acid) // *RPGM*. 2014. T. 4, № 1. C. 40–51.
162. Ahmed J. и др. Thermal properties of polylactides: Effect of molecular mass and nature of lactide isomer // *J Therm Anal Calorim.* 2009. T. 95, № 3. C. 957–964.
163. Cao X. и др. Effect of Mixed Solvents on the Structure and Properties of PLLA/PDLA Electrospun Fibers // *Fibers Polym.* 2020. T. 21, № 5. C. 970–977.
164. Chen S. C. и др. The influence of fiber diameter of electrospun poly(lactic acid) on drug delivery // *Fibers Polym.* 2012. T. 13, № 9. C. 1120–1125.
165. Wang P., Mele E. Effect of Antibacterial Plant Extracts on the Morphology of Electrospun Poly(Lactic Acid) Fibres // *Materials*. 2018. T. 11, № 6. C. 923.
166. Arrieta M. P. и др. Development of flexible materials based on plasticized electrospun PLA–PHB blends: Structural, thermal, mechanical and disintegration properties // *European Polymer Journal*. 2015. T. 73. C. 433–446.
167. Natarajan L. и др. Surface morphology of electrospun PLA fibers: mechanisms of pore formation // *RSC Adv.* 2014. T. 4, № 83. C. 44082–44088.

168. Yin J., Xu L., Ahmed A. Batch Preparation and Characterization of Electrospun Porous Polylactic Acid-Based Nanofiber Membranes for Antibacterial Wound Dressing // *Adv. Fiber Mater.* 2022. T. 4, № 4. С. 832–844.
169. Nguyen T. T. T. и др. Porous core/sheath composite nanofibers fabricated by coaxial electrospinning as a potential mat for drug release system // *International Journal of Pharmaceutics*. 2012. Т. 439, № 1–2. С. 296–306.
170. Casasola R. и др. Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: Effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter // *Polymer*. 2014. Т. 55, № 18. С. 4728–4737.
171. Fattahi F., Khoddami A., Avinc O. Poly (Lactic Acid) Nanofibres as Drug Delivery Systems: Opportunities and Challenges // *Nanomed Res J*. 2019. Т. 4, № 3.
172. Matsumine H. и др. A polylactic acid non-woven nerve conduit for facial nerve regeneration in rats // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2014. Т. 8, № 6. С. 454–462.
173. Murgia D. и др. Advance on Resveratrol Application in Bone Regeneration: Progress and Perspectives for Use in Oral and Maxillofacial Surgery // *Biomolecules*. 2019. Т. 9, № 3. С. 94.
174. Maleki H. и др. Poly(lactic acid)-Based Electrospun Fibrous Structures for Biomedical Applications // *Applied Sciences*. 2022. Т. 12, № 6. С. 3192.
175. Samokhin Y. и др. Fabrication and Characterization of Electrospun Chitosan/Polylactic Acid (CH/PLA) Nanofiber Scaffolds for Biomedical Application // *JFB*. 2023. Т. 14, № 8. С. 414.
176. Abdullah M. F. и др. Fabrication of poly(lactic acid)-cellulose acetate core-shell electrospun fibers with improved tensile strength and biocompatibility for bone tissue engineering // *J Polym Res*. 2023. Т. 30, № 7. С. 257.
177. Stachewicz U. и др. 3D imaging of cell interactions with electrospun PLGA nanofiber membranes for bone regeneration // *Acta Biomaterialia*. 2015. Т. 27. С. 88–100.
178. Sisson A. L., Ekinci D., Lendlein A. The contemporary role of ϵ -caprolactone chemistry to create advanced polymer architectures // *Polymer*. 2013. Т. 54, № 17. С. 4333–4350.
179. Neppalli R. и др. Poly(ϵ -caprolactone) filled with electrospun nylon fibres: A model for a facile composite fabrication // *European Polymer Journal*. 2010. Т. 46, № 5. С. 968–976.
180. Ghomi E. R. и др. Electrospun Aligned PCL/Gelatin Scaffolds Mimicking the Skin ECM for Effective Antimicrobial Wound Dressings // *Adv. Fiber Mater.* 2023. Т. 5, № 1. С. 235–251.
181. Lin M. и др. Synergistic Effect of Co-Delivering Ciprofloxacin and Tetracycline Hydrochloride for Promoted Wound Healing by Utilizing Coaxial PCL/Gelatin Nanofiber Membrane // *IJMS*. 2022. Т. 23, № 3. С. 1895.
182. Mitxelena-Iribarren O. и др. Drug-loaded PCL electrospun nanofibers as anti-pancreatic cancer drug delivery systems // *Polym. Bull.* 2023. Т. 80, № 7. С. 7763–7778.

183. Haroosh H. J. и др. Morphological Structures and Drug Release Effect of Multiple Electrospun Nanofibre Membrane Systems Based on PLA, PCL, and PCL/Magnetic Nanoparticle Composites // *Journal of Nanomaterials* / под ред. Yi D. K. 2022. Т. 2022, № 1. С. 5190163.
184. Eskitoros-Togay Ş. M. и др. Fabrication of doxycycline-loaded electrospun PCL/PEO membranes for a potential drug delivery system // *International Journal of Pharmaceutics*. 2019. Т. 565. С. 83–94.
185. Darbasizadeh B. и др. Electrospun Doxorubicin-loaded PEO/PCL core/sheath nanofibers for chemopreventive action against breast cancer cells // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021. Т. 64. С. 102576.
186. Heydari Z., Mohebbi-Kalhari D., Afarani M. S. Engineered electrospun polycaprolactone (PCL)/octacalcium phosphate (OCP) scaffold for bone tissue engineering // *Materials Science and Engineering*: C. 2017. Т. 81. С. 127–132.
187. Li W. и др. Electrospinning of polycaprolactone nanofibers using H₂O as benign additive in polycaprolactone/glacial acetic acid solution // *J of Applied Polymer Sci*. 2018. Т. 135, № 3. С. 45578.
188. Katsogiannis K. A. G., Vladislavljević G. T., Georgiadou S. Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation // *European Polymer Journal*. 2015. Т. 69. С. 284–295.
189. Gao Y., Callanan A. Influence of surface topography on PCL electrospun scaffolds for liver tissue engineering // *J. Mater. Chem. B*. 2021. Т. 9, № 38. С. 8081–8093.
190. Tsou S.-Y. и др. Rheological aspect on electrospinning of polyamide 6 solutions // *European Polymer Journal*. 2013. Т. 49, № 11. С. 3619–3629.
191. Niu X. и др. Electrospun polyamide-6/chitosan nanofibers reinforced nano-hydroxyapatite/polyamide-6 composite bilayered membranes for guided bone regeneration // *Carbohydrate Polymers*. 2021. Т. 260. С. 117769.
192. Fatma Nur P. и др. Fabrication of polyamide 6/honey/boric acid mats by electrohydrodynamic processes for wound healing applications // *Materials Today Communications*. 2021. Т. 29. С. 102921.
193. Zhang X., Chen X. Preparation of Polyamide 6/CeO₂ Composite Nanofibers through Electrospinning for Biomedical Applications // *International Journal of Polymer Science*. 2019. Т. 2019. С. 1–7.
194. Patel S. K. S. и др. Biotechnological Application of Polyhydroxyalkanoates and Their Composites as Anti-microbials Agents // *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates* / под ред. Kalia V. C. Singapore: Springer Singapore, 2019. С. 207–225.

195. Urtuvia V. и др. Burkholderia xenovorans LB400 possesses a functional polyhydroxyalkanoate anabolic pathway encoded by the pha genes and synthesizes poly(3-hydroxybutyrate) under nitrogen-limiting conditions // *Int Microbiol.* 2018. Т. 21, № 1–2. С. 47–57.
196. Jia K. и др. Study of Class I and Class III Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthases with Substrates Containing a Modified Side Chain // *Biomacromolecules.* 2016. Т. 17, № 4. С. 1477–1485.
197. Sharma S. K. A Handbook of Applied Biopolymer Technology: Synthesis, Degradation and Applications. 1st ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2011. 1 с.
198. Chen G.-Q., Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials // *Biomaterials.* 2005. Т. 26, № 33. С. 6565–6578.
199. Rai R. и др. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future // *Materials Science and Engineering: R: Reports.* 2011. Т. 72, № 3. С. 29–47.
200. Ecobiomaterial Research Laboratory, School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, Minden 11800 Penang, Malaysia и др. The Influence of Electrospinning Parameters and Drug Loading on Polyhydroxyalkanoate (PHA) Nanofibers for Drug Delivery // *Int. J. Biotech. Well. Indus.* 2016. Т. 4, № 4. С. 103–113.
201. Li W. и др. Bacteria-triggered release of a potent biocide from core-shell polyhydroxyalkanoate (PHA)-based nanofibers for wound dressing applications // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 2020. Т. 31, № 3. С. 394–406.
202. Fridrikh S. V. и др. Controlling the Fiber Diameter during Electrospinning // *Phys. Rev. Lett.* 2003. Т. 90, № 14. С. 144502.
203. Kriegel C. и др. Electrospinning of chitosan–poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions // *Polymer.* 2009. Т. 50, № 1. С. 189–200.
204. Abutaleb A. и др. Effects of Surfactants on the Morphology and Properties of Electrospun Polyetherimide Fibers // *Fibers.* 2017. Т. 5, № 3. С. 33.
205. Zheng J.-Y. и др. The Effect of Surfactants on the Diameter and Morphology of Electrospun Ultrafine Nanofiber // *Journal of Nanomaterials* / под ред. Liu R. 2014. Т. 2014, № 1. С. 689298.
206. Perinelli D. R. и др. Surfactant Self-Assembling and Critical Micelle Concentration: One Approach Fits All? // *Langmuir.* 2020. Т. 36, № 21. С. 5745–5753.
207. Le T. T. Y., Hussain S., Lin S.-Y. A study on the determination of the critical micelle concentration of surfactant solutions using contact angle data // *Journal of Molecular Liquids.* 2019. Т. 294. С. 111582.
208. Hindi A. и др. Exploring micellar behavior of surfactants-assisted electrospinning of polyacrylonitrile nanofibers // *Sci Rep.* 2026. Т. 16, № 1. С. 16849.

209. Norouzi M.-R. и др. Emulsion electrospinning of sodium alginate/poly(ϵ -caprolactone) core/shell nanofibers for biomedical applications // *Nanoscale Adv.* 2022. Т. 4, № 13. С. 2929–2941.
210. Zhang Y. и др. Cytotoxicity of organic surface coating agents used for nanoparticles synthesis and stability // *Toxicology in Vitro.* 2015. Т. 29, № 4. С. 762–768.
211. Isomaa B., Bergman H., Sandberg P. The Binding of CTAB, a Cationic Surfactant, to the Rat Erythrocyte Membrane // *Acta Pharmacologica et Toxicologica.* 1979. Т. 44, № 1. С. 36–42.
212. Sutormin O. S. и др. Toxicity of Different Types of Surfactants via Cellular and Enzymatic Assay Systems // *IJMS.* 2022. Т. 24, № 1. С. 515.
213. Meinhold K. L., Robinson J. L. Nonionic Surfactant as a Tool to Modify Electrospun Fiber Properties for In Vitro Fibrous Connective Tissue Models // *J Biomedical Materials Res.* 2026. Т. 114, № 1. С. e70029.
214. Stubbs S., Yousaf S., Khan I. A review on the synthesis of bio-based surfactants using green chemistry principles // *DARU J Pharm Sci.* 2022. Т. 30, № 2. С. 407–426.
215. Guilbot J. и др. Life cycle assessment of surfactants: the case of an alkyl polyglucoside used as a self emulsifier in cosmetics // *Green Chem.* 2013. Т. 15, № 12. С. 3337.
216. Moldes A. B. и др. Synthetic and Bio-Derived Surfactants Versus Microbial Biosurfactants in the Cosmetic Industry: An Overview // *IJMS.* 2021. Т. 22, № 5. С. 2371.
217. Ponciano C. S. и др. PEG -Free Nanoemulsions With Alkyl Polyglucoside and *Baccharis dracunculifolia* Essential Oil: Physicochemical Behavior, pH Dependence and Skin Repair Properties // *J Surfact & Detergents.* 2025. Т. 28, № 5. С. 1191–1211.
218. Scomoroscenco C. и др. Preparation and In Vitro Characterization of Alkyl Polyglucoside-Based Microemulsion for Topical Administration of Curcumin // *Pharmaceutics.* 2023. Т. 15, № 5. С. 1420.
219. Amsden B. In Vivo Degradation Mechanisms of Aliphatic Polycarbonates and Functionalized Aliphatic Polycarbonates // *Macromolecular Bioscience.* 2021. Т. 21, № 7. С. 2100085.
220. Xu Y. и др. Degradation Behaviors of Biodegradable Aliphatic Polyesters and Polycarbonates // *j biobased mat bioenergy.* 2020. Т. 14, № 2. С. 155–168.
221. Li Y. и др. The effect of mechanical loads on the degradation of aliphatic biodegradable polyesters // *Regenerative Biomaterials.* 2017. Т. 4, № 3. С. 179–190.
222. Anderson J. M., Rodriguez A., Chang D. T. Foreign body reaction to biomaterials // *Seminars in Immunology.* 2008. Т. 20, № 2. С. 86–100.
223. Barbeck M., Jung O. Granulocytes and their Involvement in the Foreign Body Response to Biomaterials and Tissue Repair // *In Vivo.* 2026. Т. 40, № 1. С. 1–16.
224. Badzinski T. D. и др. Effects of Enzyme Hydrolysis in Biofilm Formation and Biotic Degradation on Weathered Bioplastics // *ACS Omega.* 2025. Т. 10, № 17. С. 17394–17403.

225. Rosato A. и др. Enzymatic Degradation of the Most Common Aliphatic Bio-Polyesters and Evaluation of the Mechanisms Involved: An Extended Study // *Polymers*. 2022. Т. 14, № 9. С. 1850.
226. Khoshtinat S. State-of-the-Art Review of Aliphatic Polyesters and Polyolefins Biodeterioration by Microorganisms: From Mechanism to Characterization // *CMD*. 2023. Т. 4, № 4. С. 542–572.
227. Li Y. и др. The effect of mechanical loads on the degradation of aliphatic biodegradable polyesters // *Regenerative Biomaterials*. 2017. Т. 4, № 3. С. 179–190.
228. Dhandayuthapani B. и др. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review // *International Journal of Polymer Science*. 2011. Т. 2011. С. 1–19.
229. Ozdil D., Aydin H. M. Polymers for medical and tissue engineering applications // *J of Chemical Tech & Biotech*. 2014. Т. 89, № 12. С. 1793–1810.
230. Ahn S. и др. Soy Protein/Cellulose Nanofiber Scaffolds Mimicking Skin Extracellular Matrix for Enhanced Wound Healing // *Adv Healthcare Materials*. 2018. Т. 7, № 9. С. 1701175.
231. Chouhan D. и др. Functionalized PVA –silk blended nanofibrous mats promote diabetic wound healing via regulation of extracellular matrix and tissue remodelling // *J Tissue Eng Regen Med*. 2018. Т. 12, № 3.
232. Hu J. и др. Fabrication of Nerve Growth Factor Encapsulated Aligned Poly(ϵ -Caprolactone) Nanofibers and Their Assessment as a Potential Neural Tissue Engineering Scaffold // *Polymers*. 2016. Т. 8, № 2. С. 54.
233. Kijeńska E. и др. Electrospun bio-composite P(LLA-CL)/collagen I/collagen III scaffolds for nerve tissue engineering // *J Biomed Mater Res*. 2012. Т. 100B, № 4. С. 1093–1102.
234. Meng C. и др. Heterogeneous porous PLLA/PCL fibrous scaffold for bone tissue regeneration // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. Т. 235. С. 123781.
235. Rethinam S. и др. Electrospun nano-bio membrane for bone tissue engineering application- a new approach // *Materials Chemistry and Physics*. 2020. Т. 249. С. 123010.
236. Xu D. и др. The effect of alcoholic solutions on the thermomechanical properties of immersed poly(lactic acid) films // *J of Applied Polymer Sci*. 2023. Т. 140, № 11. С. e53489.
237. Budynas R. G. и др. Shigley's mechanical engineering design. 10. ed. in SI units. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2015. 1082 с.
238. E37 Committee. Test Method for Assignment of the Glass Transition Temperatures by Differential Scanning Calorimetry. ASTM International.
239. Yano T. и др. Orientation of poly(vinyl alcohol) nanofiber and crystallites in non-woven electrospun nanofiber mats under uniaxial stretching // *Polymer*. 2012. Т. 53, № 21. С. 4702–4708.
240. Morel A. и др. Correlating diameter, mechanical and structural properties of poly(l-lactide) fibres from needleless electrospinning // *Acta Biomaterialia*. 2018. Т. 81. С. 169–183.

241. Chandler A. и др. Stretch-Induced Microstructural Evolution of Electrospun Polycaprolactone Microfibers for Biomedical Applications // ACS Appl. Polym. Mater. 2025. Т. 7, № 13. С. 8504–8518.
242. Hermans J. J. и др. Quantitative evaluation of orientation in cellulose fibres from the X-ray fibre diagram // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 1946. Т. 65, № 6. С. 427–447.
243. Kaniyoor A. и др. Quantifying alignment in carbon nanotube yarns and similar two-dimensional anisotropic systems // J of Applied Polymer Sci. 2021. Т. 138, № 37. С. 50939.
244. Rosén T. и др. Cellulose nanofibrils and nanocrystals in confined flow: Single-particle dynamics to collective alignment revealed through scanning small-angle x-ray scattering and numerical simulations // Phys. Rev. E. 2020. Т. 101, № 3. С. 032610.
245. ISO 10993-13:2010. Biological evaluation of medical devices – Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices. International Organization for Standardization, 2010.
246. Moraczewski K. и др. PLA/PCL Polymer Material for Food Packaging with Enhanced Antibacterial Properties // Polymers. 2025. Т. 17, № 9. С. 1134.
247. Shtol V. S. и др. Polylactide/Polycaprolactone Nanofiber Scaffold Enhances Primary Cortical Neuron Growth // Polymers. 2026. Т. 18, № 2. С. 294.
248. Tsareva A. D. и др. Structural and Functional Characterization of Ultrasonically Treated PLA-PEDOT:PSS Nonwoven Composites for Soft Implantable Bioelectronics // Surfaces. 2026. Т. 9, № 2. С. 47.
249. Golubeva A. A. и др. Biocompatibility, tissue integration, and angiogenic potential of polylactic acid-based scaffolds in the chick embryo chorioallantoic membrane model // KTBM. 2026. № 1. С. 23–29.

Приложения

Приложение А

ЭДС-анализ

По данным ЭДС оценивали содержание фтора как косвенный показатель присутствия остаточного фторсодержащего растворителя. Электроформованные матриксы ПЛА-ГФИП содержали $3,27 \pm 0,15$ мас. % фтора (рисунок А.1). Последующая вакуумная сушка ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 дней) привела к снижению фтора до $0,99 \pm 0,15$ мас.%(рисунок А.2). В матрикса ПЛА-ГФИП (рисунок А.3) вытянутых в этаноле фтор не был обнаружен, что указывает на концентрацию F ниже предела обнаружения ЭДС, равного 0,1 мас.%. В матриксах ПЛА-ДТ, (рисунок А.4), хлор не был обнаружен, что указывает на концентрацию Cl ниже предела обнаружения ЭДС, равного 0,1 мас.%.

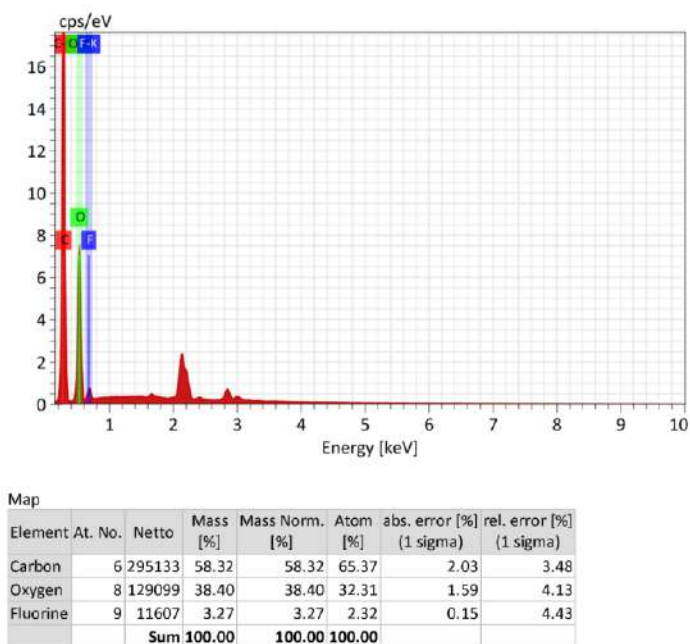


Рисунок А.1 – Результаты ЭДС-анализа содержания остаточного фтора в свежеизготовленном полимерном матриксе ПЛА-ГФИП, полученном методом электроформования

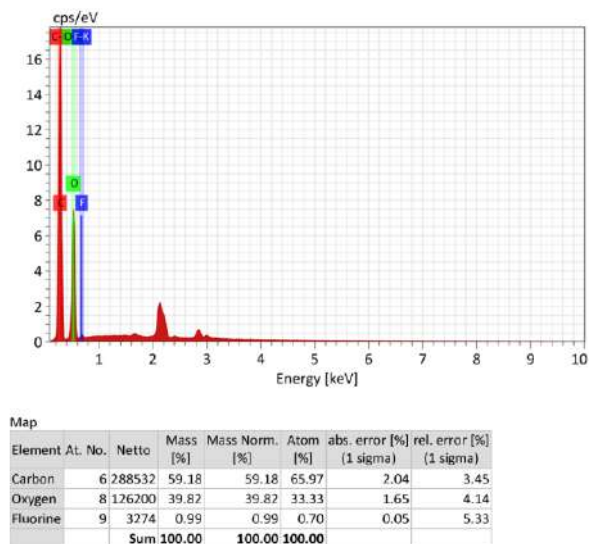


Рисунок А.2 – Результаты ЭДС-анализа содержания остаточного фтора в свежеизготовленном полимерном матриксе ПЛА-ГФИП высушенный в течение 5 дней при 37 °С в вакууме, полученном методом электроформования

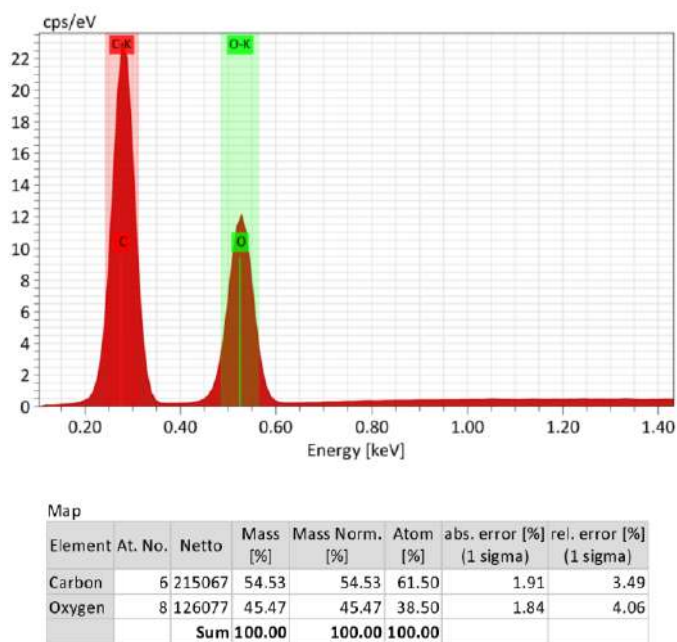
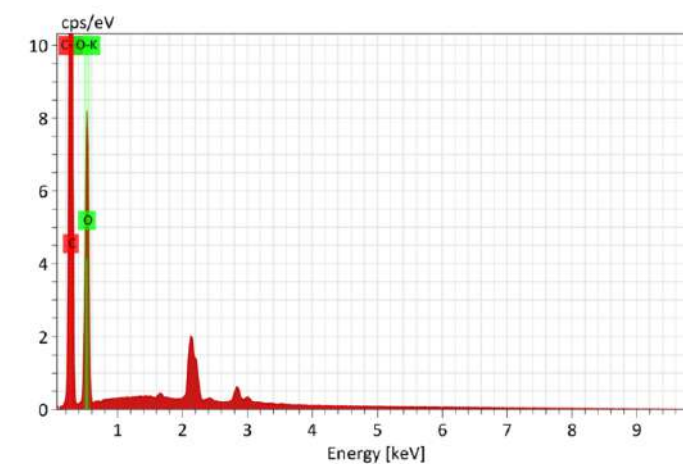


Рисунок А.3 – Результаты ЭДС-анализа содержания остаточного фтора в матриксе ПЛА-ГФИП вытянутом в спирте



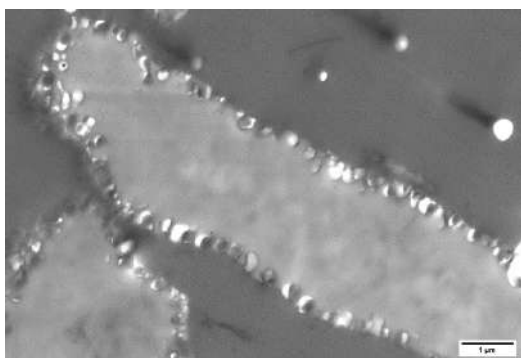
Map

Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [%]	Atom [%]	abs. error [%] (1 sigma)	rel. error [%] (1 sigma)
Carbon	6	293296	57.83	57.83	64.62	2.00	3.46
Oxygen	8	141905	42.17	42.17	35.38	1.73	4.11
		Sum	100.00	100.00	100.00		

Рисунок А.4 – Результаты ЭДС-анализа содержания остаточного хлора в свежеизготовленном полимерном матриксе ПЛА-ДТ, полученном методом электроформования

Приложение Б СПЭМ-анализ

а)



б)

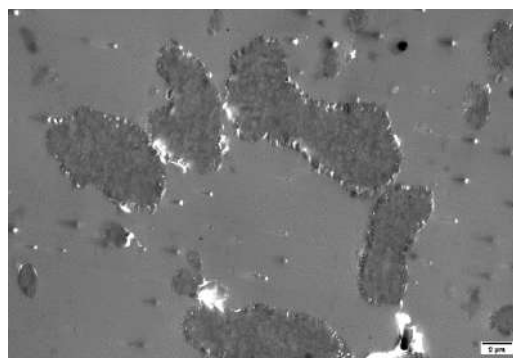


Рисунок Б.1 – Результаты СПЭМ-анализа срезов пористых волокон ПЛА-ДТ (а,б), полученные методом электроформования

Приложение В

СЭМ-анализ ПЛА-матриков

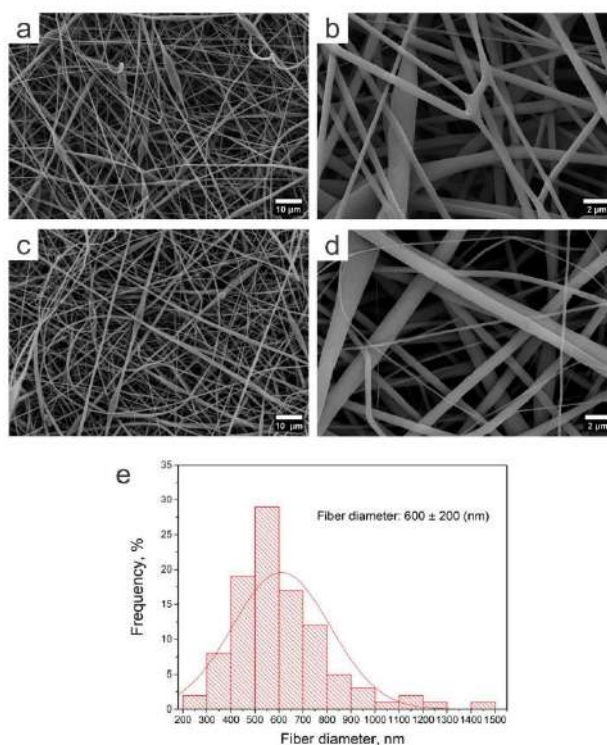


Рисунок В.1 – СЭМ-микрофотографии, изначального волокнистого матрикса из PLA без ультразвуковой обработки (a, b) и после ультразвуковой обработки (c, d), а также соответствующее распределение диаметров волокон (e) [248]

Приложение Г

Анализ биосовместимости пористых и гладких матриксов на модели ХАМ

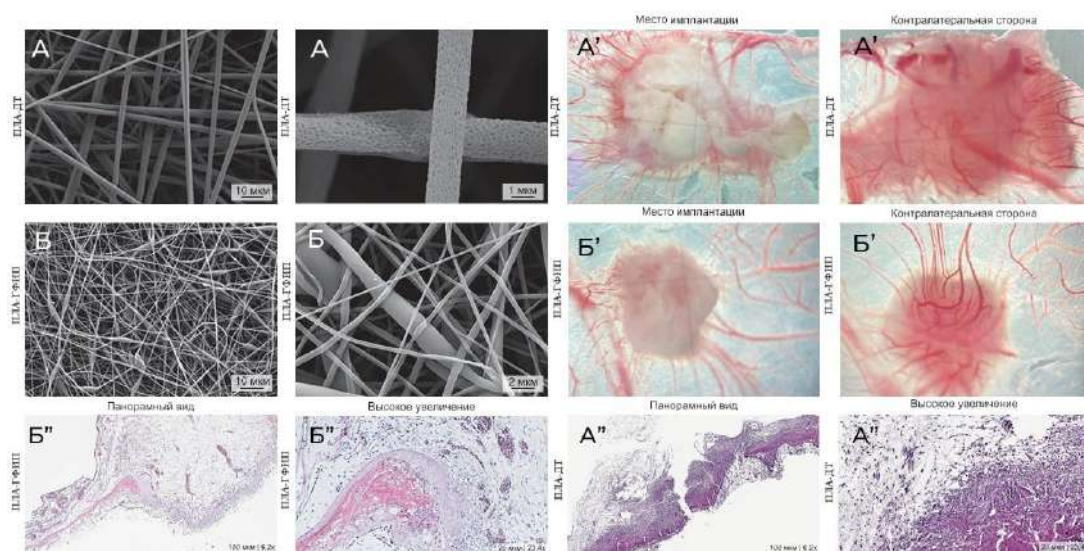


Рисунок Г.1 – СЭМ-микрофотографии, волокнистого матрикса ПЛА-ДТ (А, А'), ПЛА-ГФИП (Б, Б'); Стереомикроскопия имплантированных PLA-матриксов на момент выведения эмбрионов из эксперимента ПЛА-ДТ (А', А'), ПЛА-ГФИП (Б', Б'); Гистологический анализ имплантированных PLA-матриксов в ХАМ, окрашивание гематоксилином и эозином ПЛА-ДТ (А'', А''), ПЛА-ГФИП (Б'', Б'') (адаптировано из [249])