

УДК 615.47:616-085, 616.8  
УКПП  
№ держреєстрації 0120U101972  
Інв. №

**Міністерство освіти і науки України**  
Сумський державний університет (СумДУ)  
40007, м. Суми, вул.Римського-Корсакова, 2 тел.  
(0542)33-53-39 факс (0542)33-40-58 e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Проректор з наукової роботи  
д-р фіз.-мат.наук, професор  
\_\_\_\_\_ А.М. Чорноус

**ЗВІТ**  
**ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ**  
Композитні нервові кондуїти для лікування критичних дефектів нервів на  
основі полімерних нанофібрил та струмопровідних матеріалів

**ВСТАНОВЛЕННЯ УМОВФОРМУВАННЯ ТКАНИННОІНЖЕНЕРНИХ  
КОНСТРУКЦІЙЗ КЛІТИНАМИ НЕЙРОНАЛЬНОГО ПОХОДЖЕННЯ, ТА  
ВПЛИВ НА НАПРАВЛЕНИЙ РІСТ КЛІТИНИ НА ПОВЕРХНІ 2D МАТРИЦІ  
ЕЛЕКТРИЧНОГО ПОЛЯ, СВІТЛА ВИДИМОГО І БЛИЗЬКОГО  
ІНФРАЧЕРВОНОГО ДІАПАЗОНІВ (VISNIR), ІБІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО  
ФАКТОРА РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ FGF2  
(остаточний)**

Керівник НДР,  
канд. біол. наук

С.Д. Кириленко

2022

Рукопис закінчено 15 грудня 2022 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від \_\_\_\_\_ грудня 2022 р. № \_\_\_\_\_

**СПИСОК АВТОРІВ**

Керівник НДР, канд.біол.наук	(15.12.2022)	С.Д. Кириленко (реферат; вступ; висновки)
Відповідальний виконавець Старш. наук. співроб. канд.мед.наук	(15.12.2022)	В.В. Корнієнко (розділи 1, 2, 3)
Гол. наук. співроб. д.мед.н.	(15.12.2022)	М.В. Погорєлов (розділ 4)
Старш. наук. співроб. канд.хім.наук	(15.12.2022)	Г.О. Яновська (розділ 2, 3)
Мол. наук. співроб. канд.фіз-мат.наук	(15.12.2022)	Р.В. Вітер (розділ 2. 3)
Фахівець I категорії	(15.12.2022)	В.С. Казбан (розділ 1)
Студент	(15.12.2020)	А.А. Рошупкін (розділ 2, 3)
Студент	(15.12.2020)	Ю.В. Варава (розділ 4)
Лаборант	(15.12.2020)	Н.І. Безкоровайна (розділ 1)

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 128 с., 4 табл., 39 рис., 211 джерел

MXene, ГЕМОСТАЗ, ЕЛЕКТРОПРЯДЕНІ НАНОВОЛОКНА,  
НАНОЧАСТИНКИ СРІБЛА, ХІТОЗАН

*Об'єкт дослідження* – особливості перебігу процесів гемостазу при використанні нового кровоспинного матеріалу із природного полімеру (хітозану), виготовленого методом електроспінінгу; особливості антибактеріального впливу мембран із природного полімеру хітозану (Ch), виготовлених методом електропрядіння (електроспінінгу), та їх біосумісності в залежності від кількості інкорпорованих наночастинок срібла (AgNPs); особливості біологічних властивостей та електропровідності полікапронлактонових (PCL) електропрядених мембран, навантажених MXene.

*Предмет дослідження* – вивчення біосумісності та гемостатичної ефективності хітозанових мембран, виготовлених методом електропрядіння (електроспінінгу), порівняно зі звичайною хітозановою губкою та хітозановим аерогелем на підставі оцінки їх функціональних властивостей; вивчення функціональних та біологічних характеристик антимікробних нановолокнистих мембран хітозану виготовлених методом електропрядіння та навантажених наночастинками срібла; вивчення структурно-хімічних та біологічних властивостей електропровідних полікапрон-MXene мембран.

Для досягнення поставленої мети були визначені наступні завдання:

1. Вивчити пористість, динаміку деградації (біодеградації), антибактеріальні властивості та біосумісність матеріалів на основі хітозану залежно від способу їх виготовлення; тестувати *in vitro* взаємодію матеріалів із компонентами крові та оцінити критичні параметри активації системи гемостазу *in vivo*.

2. Вивчити фізико-хімічні та структурні характеристики, деградацію, біосумісність та антибактеріальні властивості електропрядених матеріалів Ch-

AgNPs, отриманих із використання різних співвідношень розчинників та методів нейтралізації, та в залежності від концентрації інкорпорованих наночастинок.

3. Вивчити структурно-хімічні властивості, електропровідність, контактний кут та біологічні властивості PCL-MXene мембран відповідно до кількості нанесених шарів MXene.

Методи дослідження:

1. визначення пористості матеріалів та діаметра волон з використанням скануючої електронної мікроскопії;
2. дослідження деградації та біодеградації *in vitro*;
3. експеримент на культурах клітин;
4. бактеріологічні дослідження;
5. вивчення показників системи гемостазу *in vitro*;
6. оцінка біодеградації та гемостатичних властивостей засобів *in vivo*;
7. гістологічні та імуногістохімічні дослідження;
8. вимірювання контактного кута;
9. інфрачервона та рентгенівська фотоелектронна спектроскопія;
10. скануюча електронна мікроскопія з енергодисперсійною рентгенівською спектроскопією;
11. просвічуюча електронна мікроскопія та спектроскопія втрат енергії електронів;
12. вивчення електропровідності;
13. анігіляція позитронів.

У поточних дослідженнях ми розробили високопористі електроспінінгові мембрани, які демонструють біосумісність, відповідний режим деградації та гемостатичну взаємодію із кров'ю *in vitro*. Експеримент з печінковою кровотечею *in vivo* довів високу гемостатичну ефективність матеріалу ChESM та посилену біодеградацію в пізньому післяопераційному періоді. Результати дослідження мають важливе значення у розробці ефективних та дешевих багатовимірних електроспінінгових нановолокон на основі хітозану для застосування при паренхіматозних кровотечах.

Це дослідження було спрямовано на розробку нової мембрани Ch-AgNPs з використанням системи співрозчинників трифтороцтова кислота/дихлорметан (TFA/DCM) та оцінку антибактеріального потенціалу залежно від концентрації використаних AgNPs.

В результаті виконання роботи доведено, що отримані мембрани на основі Ch з AgNPs є перспективним матеріалом для тканинної інженерії з відповідною біосумісністю і високою антимікробною здатністю після нейтралізації лугом, мають відповідний режим деградації, а також можуть в подальшому бути використанні в біоінженерії та медицині.

Ми застосували позитронну анігіляційну спектроскопію (PAS) для моніторингу дефектів у поверхневих шарах MXene та співвіднесення їх з електричною провідністю. Крім того, рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (XPS), скануюча електронна мікроскопія (SEM) з енергодисперсійним рентгенівським аналізом (EDX), трансмісійною електронною мікроскопією (TEM) та біологічними методами були використані для дослідження композитних каркасів. Це поєднання технік, яке не було використано в попередніх дослідженнях, надало нову інформацію про мікро- та наноструктуру, елементарний та фазовий склад, клітинне прикріплення, а також клітинну проліферацію та бактеріальну адгезію.

Дослідження провідності композитних скаффолдів у широкому діапазоні температур, включаючи її індуктивну та ємнісну складові, показало можливість використання мембран PCL з покриттям MXene як провідних біоматеріалів. Електронна структура MXene та дефекти, що утворилися в його шарах, корелювали з біологічними властивостями каркасів *in vitro* та в тестах на бактеріальну адгезію. Подвійні та потрійні покриття MXene створили відповідне середовище для прикріплення та проліферації клітин із м'яким антибактеріальним ефектом. Поєднання структурних, хімічних, електричних і біологічних властивостей композиту PCL-MXene продемонструвало його перевагу перед існуючими провідними каркасами для тканинної інженерії.

## ЗМІСТ

	<b>с.</b>
Перелік скорочень, умовних познач, одиниць і термінів .....	10
ВСТУП .....	12
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	15
2 БІОСУМІСНІСТЬ ТА ГЕМОСТАТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ ХІТОЗАНОВИХ МЕМБРАН ВИГОТОВЛЕНИХ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОСПІНІНГУ .....	23
2.1 Матеріали і методи .....	23
2.1.1 Виготовлення хітозанових матеріалів ....	23
2.1.2 Скануюча електронна мікроскопія (SEM) .....	24
2.1.3 Пористість і щільність .....	24
2.1.4 Дослідження деградації та біодеградації (in vitro).....	25
2.1.5 Антибактеріальний тест .....	26
2.1.6 Аналіз цитотоксичності та Live/Dead фарбування.....	26
2.1.7 Показники системи гемостазу in vitro .....	27
2.1.8 Експеримент на тваринах .....	28
2.1.9 Гістлогічні та імуногістохімічні дослідження .....	29
2.1.10 Статистична обробка даних .....	30
2.2 Результати дослідження властивостей хітозанових мембран та хітозанових губок .....	31
2.2.1 Скануюча електронна мікроскопія (SEM) .....	31
2.2.2 Пористість і щільність .....	31
2.2.3 Деградація та біодеградація .....	33
2.2.4 Антибактеріальний тест .....	33
2.2.5 Аналіз цитотоксичності та Live/Dead фарбуванн .....	34
2.2.6 Показники системи гемостазу in vitro .....	35
2.2.7 Експеримент на тваринах .....	35
2.2.8 Гістологічні та імуногістохімічні дослідження .....	36

2.3	Результати дослідження властивостей хітозанових мембран та хітозанових аерогелів .....	42
2.3.1	Скануюча електронна мікроскопія (SEM) .....	42
2.3.2	Пористість і щільність .....	43
2.3.3	Деградація та біодеградація .....	43
2.2.4	Антибактеріальний тест .....	44
2.3.5	Аналіз цитотоксичності та Live/Dead фарбуванн .....	45
2.3.6	Показники системи гемостазу <i>in vitro</i> .....	46
2.3.7	Експеримент на тваринах .....	47
2.3.8	Гістологічні та імуногістохімічні дослідження .....	53
2.4	Обговорення .....	55
3	АНТИМІКРОБНІ НАНОВОЛОКОННИСТІ МЕМБРАНИ ХІТОЗАНУ ВИГОТОВЛЕННІ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОПРЯДІННЯ, ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНІ НАНОЧАСТИНКАМИ СРІБЛА.....	59
3.1	Матеріали і методи .....	59
3.1.1	Виготовлення нановолокон Ch-AgNPs .....	59
3.1.2	Морфологія нановолокон .....	59
3.1.3	Антимікробна активність мембран Ch-AgNPs.....	60
3.1.4	Зображення біоплівки (SEM) .....	61
3.1.5	Статистичний аналіз .....	61
3.2	Результати.....	61
3.2.1	Морфологія нановолокон .....	61
3.2.2	Антимікробна активність.....	62
3.2.3	Зображення біоплівки (SEM) .....	64
3.3	Обговорення.....	64
4	ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОВОЛОКНИСТИХ МЕМБРАН ВИГОТОВЛЕНИХ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОПРЯДІННЯ ІЗ ДОДАВАННЯМ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА .....	66
4.1	Матеріали та методи.....	66

4.1.1 Приготування розчинів хітозану, електропрядіння нановолокнистих мембран хітозану та їх нейтралізація лугом .....	66
4.1.2 Скануюча електронна мікроскопія (SEM) та енергодисперсійне рентгенівське випромінювання (EDX).....	67
4.1.3 Здатність до набухання (SD) і втрата ваги (WL).....	67
4.1.4 Дослідження клітинної культури <i>in vitro</i> .....	68
4.1.5 Бактеріологічний експеримент.....	69
4.1.6 Статистичний аналіз .....	69
4.2 Результати.....	69
4.2.1 SEM і EDX .....	69
4.2.2 Здатність до набухання (SD) і втрата ваги (WL).....	72
4.2.3 Дослідження клітинної культури <i>in vitro</i> .....	74
4.2.4 Антибактеріальна ефективність волокнистих мембран Ch-TFA/DCM з наночастицями срібла .....	75
<b>5 ПОЛІКАПРОН-МХЕНЕ НАНОВОЛОКНИСТІ МЕМБРАНИ ДЛЯ</b>	
<b>ТКАНИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ.....</b>	<b>78</b>
5.1 Матеріали та методи.....	78
5.1.1 Виготовлення нановолокнистих мембран з PCL.....	78
5.1.2 Синтез і характеристика MXene.....	78
5.1.3 Імобілізація MXene на нановолоконних мембранах PCL.....	79
5.1.4 Вимірювання контактного кута.....	79
5.1.5 Інфрачервона та рентгенівська фотоелектронна спектроскопія.....	80
5.1.6 Скануюча електронна мікроскопія з енергодисперсійною рентгенівською спектроскопією.....	80
5.1.7 Просвічуюча електронна мікроскопія та спектроскопія втрат енергії електронів.....	81
5.1.8 Електропровідність.....	81
5.1.9 Анігіляція позитронів.....	85
5.1.10 Біосумісність.....	85
5.1.11 Антибактеріальні властивості.....	86



5.2	Результати.....	87
5.2.1.	Структурно-хімічні властивості.....	87
5.2.2	Електропровідність.....	94
5.2.3	Позитронна анігіляція.....	96
5.2.4	Контактний кут.....	99
5.2.5	Біологічні властивості.....	101
	ВИСНОВКИ.....	105
	ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ.....	107

**ПЕРЕІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ**

Ch – хітозан

PLA – полілактид

PLGA – полилактид-ко-гликолид

PEO – поліетиленоксид

MGM – місцеві гемостатичні матеріали

RBC – еритроцитів

PLT – активацією тромбоцитів

ChSp – хітозанова гемостатична губка

ChEsM – хітозанова електроспінінгова мембрана

SEM – скануюча електронна мікроскопія

SBF – імітованій рідині тіла

ADSC – стовбурові клітини, отримані з жиру

FBS – фетальна бичача сироватка

PI – йодид прорідію

FDA – діацетат флуоресцеїну

ШС – швидкість сорбції крові

ЗАК – загальний аналіз крові

КТ – кількість тромбоцитів

ШРТ – ширина розподілу тромбоцитів

TRIS EDTA – трис-ацетатный буфер

DAB –діамінобензидин

ChAG – аерогель хітозану

VEGF – судинний фактор росту ендотелію

bFGF – основний фактор росту фібробластів

EGF – епідермальний фактор росту

Ang1 – ангіопоетин-1

PDGF – фактор росту тромбоцитів

HGF – фактор росту гепатоцитів

TFA - трифтороцтова кислота

DMS - дихлорметан

AgNP - наночастинки срібла

MIC - мінімальна інгібуюча концентрація

NaOH - гідроксид натрію

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - карбонат натрію

Ag<sup>+</sup> - іони срібла

MW - молекулярна маса

DA - ступень ацетилювання

ECM - нативний позаклітинний матрикс

PCL - полікапронлактон

PAS - позитронна анігіляційна спектроскопія

EELS - спектроскопії втрати енергії електронів (EELS)

MHB - бульйон Мюллера-Гінтона

## ВСТУП

Паренхіматозні органи в основному вразливі при тупій травмі живота. Незважаючи на прогрес у хірургічних методах гемостазу, пошкодження печінки все ще є серйозною проблемою при хірургічному втручанні, і близько 80% ізольованих проникаючих пошкоджень печінки можна успішно лікувати, використовуючи неоперативне лікування [1]. Це стало стандартом використання постійного спостереження або ангіоемболізації [2]. Але неконтрольована кровотеча при пошкодженні печінки високого ступеня (шкала травм органів IV-V ступеня) спричиняє смерть у 42–49% у перші 24 години після травми та близько 14–23% важких пошкоджень печінки потребує екстреної операції [3, 4]. Стратегії печінкової гемостатики включають ектомію лівої частки, резекційну дебридацію, перигепатичну фіксацію, внутрішньопечінкову балонну тампонаду або місцеве використання гемостатичних засобів [5, 6].

Більшість місцевих гемостатичних матеріалів (МГМ) є біологічного походження і діють як активні та пасивні агенти. Активний МГМ, виготовлений з компонентів крові (наприклад, тромбіну або фібрину), може безпосередньо впливати на механізми згортання крові, що призводить до швидкого її згортання. Пасивний МГМ, виготовлений з целюлози, желатину, колагену тощо, діє шляхом поглинання плазми та агрегування клітин крові, що призводить до утворення матриксу для кращого згортання [7]. Реалізація активних МГМ в хірургічній практиці значно покращилася, однак їх застосування обмежене через високу вартість, ризики забруднення, короткий термін зберігання, низьку портативність, мінливість продуктивності та імунологічні побічні ефекти [8]. Незважаючи на широкий спектр МГМ, доступних на медичному ринку, все ще існує потреба у розробці нових матеріалів. Висока ефективність як кровоспинного агента, безпека, низька вартість, простота підготовки, відмінна здатність до біодеградації та біосумісність є основними вимогами до МГМ [9].

Перспективним біополімером, що демонструє як гемостатичні властивості, так і високу біосумісність, є хітозан (Ch) – природний полікатионний

полісахарид, який в основному отримують із хітинового покриву краба або деяких грибів. Він демонструє високу біосумісність, біологічну здатність до розкладання, нетоксичність та бактеріостатичні властивості. Гемостатична здатність хітозану проявляється агрегацією еритроцитів (RBC), активацією тромбоцитів (PLT), і впливом на контактну систему активації [10-11]. Аміно- та гідроксильна групи Ch подібні до глікозаміногліканів печінки, що робить його найбільш придатним для використання [12]. Але властивості хітозану сильно залежать від молекулярної маси, ступеня деацетилювання і фізичної форми матеріалу [13]. Хітозан спричиняє найкращу агрегацію крові із 75-88% деацетилюванням та молекулярною масою 50-190 кДа [14]. Також хітозан може мати різні форми, такі як гель, плівка, губка, аерогель, мембрана. Для кровоспинних цілей переважно використовуються губки або порошки на основі хітозану, які мають значну сорбцію і прості у використанні [15]. Критичним обмеженням для губки на основі Ch є час біодеградації, який може призвести до тривалих післяопераційних ускладнень та зменшити регенеративний потенціал печінки. Ці недоліки стимулюють впровадження нових технологій для покращення біосумісності і біодеградації матеріалів на основі хітозану. Методи електропрядіння забезпечують можливість створення нановолокнистої структури з низькою щільністю, що може подолати це обмеження [16].

Електроспінінг – це універсальна техніка для отримання нанорозмірних волокон з різних природних та синтетичних полімерів, включаючи хітозан, його похідні та кополімерні суміші [17]. Деякі дослідження продемонстрували електроспінінг як вдосконалену техніку розробки передових технологій для створення з хітозану замінників шкіри, конструкції тканинної інженерії, штучних органів тощо [18]. Волокниста електроспінінгова мембрана подібна до позаклітинного матриксу і має переваги через високу пористість із змінним розподілом пор за розміром та вищим співвідношенням їх до площі поверхні.

Застосування нанотехнологій у розробці біоматеріалів в даний час має потенційний інтерес для медичного застосування. Серед полімерів для цієї мети

хітозан (Ch) є одним з найбільш перспективних через його біосумісність, біодеградацію та антибактеріальні властивості. Електропрядіння - це економічна та добре відтворювана процедура виготовлення полімерних нановолоконних мембран. Проте, електропрядіння хітозанових нановолокон має деякі проблеми для отримання однорідних волокон і запобігання їх пошкодження. Щоб подолати деякі з цих труднощів, поточні дослідження спрямовані на виготовлення нановолокнистої мембрани з хітозану методом електропрядіння та забезпечення нейтралізації матеріалу 1M гідроксидом натрію (NaOH), оцінку антибактеріальної активності та цитотоксичності оброблених нановолокон хітозану залежно від різної концентрації наночастинок срібла (AgNPs).

Нові електропровідні матеріали для тканинної інженерії необхідні для розробки регенеративних стратегій для нервової, м'язової та серцевої тканин. Полікапролактон (PCL) використовується для отримання біосумісних і біологічно розкладних нановолоконних каркасів методом електроспінінгу. MXenes, великий клас біосумісних двовимірних наноматеріалів, можуть зробити полімерні каркаси провідними та гідрофільними. Проте розуміння того, як їхні фізичні властивості впливають на потенційні біомедичні застосування, досі не вистачає.

## 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Операція на печінці – це складна процедура, яка застосовується у випадку розриву печінки, пухлин, метастазів раку прямої кишки або трансплантації печінки, і кровотеча є ускладненням, що загрожує протягом усієї операції. Гемостаз може бути здійснений різними способами, такими як моно- або біполярна електрокаутеризація, герметизуючі пристрої, такі як Ligasure®, аргоно-плазмова коагуляція, відсікання доступних трубчастих структур, накладення швів, нанесення місцевих гемостатичних матеріалів, тампонада рани [19]. Серед цих стратегій застосування місцевих гемостатичних матеріалів МГМ показало високу ефективність. МГМ сприяють коагуляції та запобігають рецидивам кровотеч, що зменшують час операції, обсяг переливання крові та ймовірність повторної лапаротомії [20].

Впровадження активних МГМ в хірургічну практику значно покращило клінічні результати. Однак їх застосування обмежене через високу вартість, ризики забруднення, короткий термін зберігання, низьку портативність, мінливість продуктивності та імунологічні побічні ефекти [21]. Незважаючи на широкий асортимент МГМ, доступний на медичному ринку, все ще існує необхідність у розробці нових матеріалів. Очікуються високі гемостатичні показники, безпека, низька вартість, проста підготовка, відмінна біологічна здатність та біосумісність [22]. Колаген, желатин, шовк та хітозан є привабливими ресурсами для подальшого розвитку кровоспинних матеріалів [23-25]. Хітозан (Ch), поліаміносахарид, отриманий шляхом деацетилювання хітину, є найбільш перспективним матеріалом для МГМ завдяки високій біосумісності, біодеградації, гнучкості, а також антимікробній та гемостатичній активності [26]. Гемостатичні ефекти Ch включають агрегацію еритроцитів, стимуляцію тромбоцитів та активацію контактної системи з утворенням 3D-структури [27, 28]. Ch може бути модифікований у різні форми: плівки, губки, аерогелі, частинки та волокна, які придатні для гемостатичного застосування [29, 30].

Декілька гемостатичних матеріалів на основі Ch, схвалених для зовнішнього клінічного застосування, в основному для контролю артеріальних кровотеч (Celox®, TraumaStat®, пов'язка HemCon® тощо) [31]. В останні роки для контролю паренхіматозних кровотеч інтенсивно вивчаються численні губки на основі Ch [32, 33]. Наші попередні результати показали високу ефективність просоченої хітозаном марлі для зупинки артеріальних кровотеч. Ми продемонстрували достатню взаємодію речовин і крові та помітні антибактеріальні ефекти Ch-аерогелю *in vitro* [34-35]. Незважаючи на високу ефективність *in vitro*, сорбційну здатність крові та низьку токсичність, продемонстровані в різних дослідженнях, існують деякі недоліки матеріалів на основі Ch через використання оцтової кислоти як розчинника для його обробки. Оцінка довгострокових результатів *in vivo* вказувала на недостатню деградацію та місцеву запальну реакцію. Крім того, традиційні губки не можуть зберегти свою форму при стисненні через свою крихкість [36]. Ці недоліки стимулюють впровадження нових технологій для поліпшення біосумісності та біодеградації матеріалів на основі Ch.

Електроспінінг – це універсальна техніка, яка дозволяє отримувати нанорозмірні волокна з природних та синтетичних полімерів, включаючи хітозан, його похідні та суміші кополімерів [37-38]. Волокнисті мембрани, виготовлені методом електроспінінгу, подібні до позаклітинного матриксу та мають переваги високої пористості [39]. Попередні дослідження продемонстрували високу згортаючу активність крові та біосумісність електроспінінгових матеріалів на основі хітозанів. Однак через швидку деградацію їх використання у клінічній практиці обмежене [40]. Численні дослідження показали застосування різних полімерів, включаючи PLA, PLGA та PEO, для армування хітозанових мембран [41]. Проте дані щодо ефективності та властивостей електроспінінгових кополімерних матеріалів є обмеженими [42]. Це дослідження мало на меті оцінити гемостатичну ефективність, біосумісність та деградацію нещодавно розкритих хітозанових мембран, виготовлених



методом електроспінінгу, порівняно з хітозановим аерогелем та звичайними хітозановими губками.

Електропрядіння – це спосіб виготовлення нановолокон, який передбачає створення електрично зарядженого струменя з краплі розчину полімеру та збирання нановолокон на колекторі [74]. Виробництво нановолокнистих мембранів за допомогою електропрядіння може генерувати матеріали, надзвичайно аналогічні нативним тканинам і позаклітинному матриксу. Нині багато природних та синтетичних полімерів використовують для виробництва матеріалів для тканинної інженерії, загоєння ран, контролю гемостазу тощо [75]. Хітозан (Ch) є одним із найперспективніших біополімерів для розробки нанопористих біологічних замінників завдяки чудовому регенеративному потенціалу, антибактеріальним властивостям та здатності до контрольованої деградації [76]. Електропрядені нановолокна, виготовлені з Ch, мають велике медичне значення особливості застосування, такі як висока площа поверхні та пористість, біосумісність та антибактеріальні властивості [77].

Завдяки біосумісності та антибактеріальним властивостям матеріали на основі хітозану використовуються в місцях інфекції для захисту тканин від вторинного бактеріального забруднення. Антибактеріальну ефективність хітозану можна пояснити кількома запропонованими механізмами залежно від його молекулярної маси (MW) та ступеня ацетилювання (DA) [78]. Таким чином, низькомолекулярний хітозан, проникаючи крізь клітинну стінку, пригнічує синтез мРНК і білка [79]. Антимікробні властивості олігомерів хітозану посилюються за рахунок позитивних зарядів полімерного ланцюга та вільних аміногруп. Отже, збільшення кількості аміногруп призводить до поліпшення антимікробної активності за рахунок зміни проникності клітинної стінки бактерій. Протоновані амінні групи хітозану зв'язують негативно заряджені бактерії, порушуючи їхнє розмноження [80]. Таким чином, низькомолекулярний Ch проникає через клітинну стінку, пригнічує синтез мРНК і білка [81]. Крім того, Ch може зв'язуватися з негативно зарядженою бактеріальною клітинною стінкою, руйнуючи клітину, таким чином змінюючи проникність мембрани, з

подальшим приєднанням до ДНК, викликаючи пригнічення реплікації ДНК і згодом загибель клітини [83].

Утворення бактеріальної біоплівки є складною проблемою в медицині через колонізацію медичних імплантатів у тканинах людини та хронічні інфекції [84, 85]. Більше того, біоплівки є одним із факторів, що забезпечують мікробну толерантність і стійкість до антибіотиків. З іншого боку, токсичні та побічні ефекти антибіотиків обмежують їх мінімальну концентрацію *in vivo* [86].

Тим не менш, хоча наночастинки срібла (AgNPs) є одними з найпривабливіших протимікробних сполук, застосування срібловмісних наноматеріалів для мікробної інактивації вимагає ефективних стратегій застосування, щоб уникнути їх потенційної токсичності.

Протимікробна дія хітозанових мембран з електропрядінням очевидна, особливо в поєднанні з AgNP. Цей аспект передбачає вивчення антибактеріальних властивостей матеріалів залежно від концентрації використовуваного срібла.

Електропрядіння хітозанових нановолокон викликає деякі проблеми через складність вибору відповідних розчинників і стійкість залежно від властивостей волокна, параметрів обробки та концентрації розчину для отримання однорідних волокон і запобігання їх пошкодженню. На діаметр волокон і ширину їх розподілу впливають різноманітні параметри розчину та обробки, включаючи співвідношення розчинників, внутрішній діаметр голки, прикладену напругу та відстань наконечник-колектор [87]. Для подолання деяких з цих труднощів в якості розчинників використовували трифторуксусну кислоту (TFA) та дихлорметан (DMC) [88]. Однак залишкові розчинники в електропрядних мембранах впливають на біологічні властивості хітозанових нановолокон, пошкоджують волокнисту структуру нановолокон і роблять їх розчинними в нейтральних або слабких основних водних розчинах в результаті високої розчинності в цих водних середовищах  $-NH_3^+$   $CF_3COO^-$  залишки солі, які утворюються при розчиненні хітозану в TFA. Подальшу обробку в абсолютному етанолі, суміші етанол-вода, придатну для підтримки волокнистої

структури та отримання стабільних хітозанових мембран, проводили з використанням гідроксиду натрію (NaOH) та карбонату натрію (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) [89][90].

Подальша обробка хітозанових каркасів лугом впливає на ступінь їх набухання та механічні властивості [91]. Порівняльні дослідження показали різну протимікробну активність хітозанових нановолокон і хітозану в розчиненому стані та запропонували комбінувати хітозан з іншими антимікробними засобами для отримання синергетичного ефекту [92]. Агенти срібла, такі як наночастинки Ag (AgNP), можуть бути включені в нановолокна хітозану, забезпечуючи стійке вивільнення іонів срібла (Ag<sup>+</sup>), які є антибактеріальними агентами з антибактеріальними властивостями широкого спектру дії та покращують антибактеріальні властивості хітозану [93][94]. Виявлено, що електропрядні нановолокна з нанокристалічними частинками гідроксиapatиту, що містять іони срібла (Ag<sup>+</sup>), демонструють антибактеріальну ефективність проти кишкової палички [95]. AgNP можуть зв'язуватися з клітинною стінкою бактерій і викликати пошкодження мембрани, витік клітинного вмісту та загибель бактерій [96] [97]. Крім того, антибактеріальний ефект AgNP на грамнегативні бактерії є більш потужним, ніж на грампозитивні бактерії, через різницю в товщині клітинної стінки між грампозитивними бактеріями (30 нм) і грамнегативними бактеріями (3–4 нм) [98]. Крім того, позитивний заряд забезпечує електростатичну взаємодію між AgNPs та негативно зарядженою клітинною мембраною мікроорганізмів [99]. Крім прямого контакту з мікроорганізмами, антибактеріальні механізми AgNP можуть сприяти вивільненню іонів срібла, які можуть викликати дезактивацію білка клітинної мембрани. Антибактеріальний ефект AgNP можна пояснити виробництвом високих рівнів активних форм кисню (АФК) і видів вільних радикалів, які призводять до апоптозоподібної реакції, перекисного окислення ліпідів і пошкодження ДНК [100][101].

Деякі автори також стверджували про потенційну токсичність AgNP і дійшли висновку, що AgNPs викликають цитотоксичність у різних клітинних

лініях залежно від дози, але вони не запропонували, як зменшити ефект токсичності [102][103]. Біосумісність є життєво важливою вимогою для застосування в медицині, яку можна вирішити шляхом зміни морфології та характеристик поверхні AgNPs та модифікації поверхні за допомогою біомолекул, полімерів або іонів металів [104][105].

Антимікробна дія хітозанових мембран з електропрядінням не визначена, зокрема поєднання Ch з AgNP. Цей аспект вимагає вивчення цитотоксичності та варіацій морфології залежно від співрозчинників та обробки лугом. Метою дослідження було оцінити структуру, біодеградацію, антибактеріальну поведінку та цитосумісність нових електропрядних нановолокон AgNPs-Ch.

Провідність і здатність до електростимуляції є додатковими факторами, які мають істотний вплив на успіх тканинної інженерії для багатьох застосувань, таких як нейронні канали, серцеві патчі та м'язові трансплантати. Ці каркаси можуть також забезпечувати цілеспрямовану доставку ліків і діяти як гнучкі електроди [135,136]. Провідні біоматеріали з індивідуальними механічними, структурними та функціональними властивостями можуть бути ефективними засобами для сприяння проліферації та диференціації клітин, що реагують на електричні подразники, таких як нейрони [137], кісткові [138] і м'язові клітини [139]. Серцева тканина та нейронні кондуїти є найбільш складними матеріалами, які потребують електропровідних скафолдів з провідними властивостями, що піддаються контролю. Незважаючи на численні дослідницькі зусилля [140–142], все ще є великою проблемою забезпечити баланс між біосумісністю і провідність скафолдів.

Матеріали на основі вуглецю (в тому числі із сімейства графену), провідні полімери та провідний метал і наночастинки вуглецю є основними кандидатами на розвиток електропровідних біоматеріалів. Вони використовуються як плівки, нановолокна, гідрогелі та тривимірні пористі каркаси для полегшення регенерації тканин [143,144]. Незважаючи на обнадійливі результати, про які повідомляється в літературі, всі матеріали які є електропровідними, мають певні недоліки, які обмежують їх використання в клінічній практиці. Електропровідні

полімери на органічній основі, такі як поліпірол (PPY), поліанілін (PANI) і полі(3,4-етилендіокситіофен) демонструють задовільну електропровідність, оптичні властивості та біосумісність [145,146]. Проте більшість електропровідних полімерів не розчиняються у воді і не розкладаються *in vivo*. Олігомери електропровідних полімерів, такі як олігоанілін, можуть розкладатися, але за втрачається їх провідність [147]. Крім того, вони мають погану гнучкість і можуть ініціювати хронічне запалення.

Матеріали на основі вуглецю використовуються для виготовлення імплантатів завдяки їх чудовій провідності та механічним властивостям [151,152]. Хоча численні дослідження демонструють сприятливі характеристики матеріалів на основі вуглецю, все ще існує необхідність дослідити їх цитотоксичність або генотоксичність, які певною мірою залежать від дозування, часу експозиції, кількості шарів нанесення, бічних розмірів, форми та хімічних властивостей [153]. Крім того, більшість з них не розкладаються в організмі.

В останні роки нове велике сімейство двовимірних наноматеріалів, MXenes, продемонструвало перспективність біомедичного застосування, в тому числі в провідних каркасах [154]. MXene мають загальну формулу  $M_{n+1}X_nT_x$  ( $n = 1, 2, 3$  або  $4$ ), де  $M$  означає ранній перехідний метал, такий як  $Ti, V$  тощо,  $X$  означає вуглець та/або азот, і  $T$  – для поверхневих груп ( $=O, -OH$ , галогени або халькогени). Вони є 2D наноматеріалами з високою електронною та іонною провідністю [155], регульованим поверхневим плазмонним резонансом, високою площею поверхні та функціональною поверхнею, які дозволяють застосовувати їх у фототермічній терапії, для доставки ліків, діагностичної візуалізації, створення біосенсорів та тканинної інженерії [156–159].

Крім того, електронна провідність зберігається після функціоналізації поверхні, включаючи додавання органічних і біомолекул. На цей час досліджено лише кілька карбідних і карбонітридних MXenes для біомедичного застосування [160]. Плівки  $Ti_3C_2T_x$  використовувалися як епідермальні та імплантовані електроди для моніторингу функції мозку та м'язів [161]. Вони також добре працювали в нервових каналах і не пригнічували зростання нейронів [162]. Ми

продемонстрували можливість використання MXene для модифікації електропряденого полімеру нановолокнистих мембран і для досягнення їх високої провідності [163,164]. Проте вдосконалення та оптимізація методів осадження, а також більш детальна біомедична характеристика MXenes як *in vitro*, так і *in vivo* залишається актуальною.

Двовимірні наноструктури, такі як MXenes і графен, утворюють інтерфейси великої площі на нанорозмірі, тоді як полімери, навпаки, створюють вузли високої молекулярної маси [165]. Незважаючи на досить велику кількість публікацій у цій галузі, є ще багато питань, на які потрібно відповісти, щоб покращити наше розуміння про фізико-хімічні процеси на атомарному рівні та електронні властивості поверхневих шарів MXenes та їхні інтерфейси. Неоднорідності поверхні займають центральне місце в багатьох областях техніки, в т.ч біології [166], і передбачається, що нанодефекти можуть погіршити електронні властивості наноматеріалів [167]. Зокрема, наявність дефектів поверхні може вплинути на властивості змочування поверхні [168], що, у свою чергу, може вплинути на їх біосумісність. Тому композитні біоматеріали, особливо ті, що мають неоднорідну поверхню, вимагають ретельних досліджень їх nano- та мікроструктури.

PAS є неруйнівним методом для дослідження нанорозмірних дефектів та дефектів твердих тіл [169]. Важливо, що PAS, на відміну від інших методів, покриває масштаб від nano- до макророзмірності [170]. Взаємодія матриці з 2D пластівцями створює вільнооб'ємні похідні (вакансії, дивакансії та їх комплекси, висячі атоми, нановіди тощо), які можуть бути проаналізовані за допомогою PAS. Крім того, позитроній (позитрон у зв'язаному стані) можна хімічно погасити або інгібувати молекулами полімеру, що призводить до зміни швидкості анігіляції. Тому аналіз в часу життя позитронів надає інформацію про функціональні групи всередині композитного біоматеріалу. Такий аналітичний підхід дозволяє досліджувати межі розділу між полімерною основою та поверхнею MXene; та їх вплив на електричні та біологічні властивості з урахуванням фізико-хімічні основи компонентів композитних каркасів.

## 2 БІОСУМІСНІСТЬ ТА ГЕМОСТАТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ ХІТОЗАНОВИХ МЕМБРАН ВИГОТОВЛЕНИХ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОСПІНІНГУ

### 2.1 Матеріали і методи

#### 2.1.1 Виготовлення хітозанових матеріалів

Порошок хітозану (Ch) з низькою молекулярною масою та 95% ступенем деацетилювання, порошок поліетиленоксиду (PEO) був придбаний у компанії Glentham Life Sciences. L-аспарагінова кислота та L-глутамінова кислота, 1,2-пропанодіол, 95% етанол та лізоцим людини у Sigma Aldrich, Сент-Луїс, Міссурі, США.

Хітозанові губки (ChSp) були виготовлені з хітозану та 1% оцтової кислоти (YuDa Chemicals, Циндао, КНР). Розчин перемішували протягом 24 годин при кімнатній температурі до повної однорідності. Готовий розчин поміщали в реакційний посуд з висотою колони не більше 1,0 см. Розчин полімеру заморожували при  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 24 годин, а потім сушили у вакуумній камері (0,1 Па, 24 години).

Виробництво аерогелю хітозану (ChAG) проводилось у мікрохвильових умовах відповідно до принципів зеленої хімії. 0,5 г Ch розчиняли у водному розчині суміші L-аспарагінової та L-глутамінової амінокислот. Через 30 хвилин додавали 10 мл пропіленгліколю. Випромінювання мікрохвиль впливало на однорідний розчин протягом 1 хв до повного випаровування води (потужність 900 Вт). Потім приготовлений розчин зшивали протягом 2 хв (потужність 900 Вт). Отримані Ch гідрогелі промивали дистильованою водою до рН 7 і ліофілізували для перетворення в аерогелі.

Хітозанові електроспінінгові мембрани (ChEsM) були виготовлені з порошку хітозану і поліетиленоксиду (PEO) порошку (400 г/моль). Ch (2 г) та PEO (3 г) розчиняли у 100 мл 50% оцтової кислоти при перемішуванні протягом 24 годин при кімнатній температурі. Після повного отриманого розчинення розчини змішували у співвідношенні PEO/Ch=3/1. Провідність отриманого

розчину становила  $1487 \mu\text{S}/\text{cm}$ . Процес електрспінінгу проводили при кімнатній температурі та відносній вологості повітря 15-20% в приладі RT-Advanced machine (Linari Engineering, Піза, Італія). Розчин Ch/PEO виливали у скляний шприц об'ємом 10 мл з діаметром голки 0,6 мм. Відстань між голкою та колектором становила 12 см. Параметри електрспіну встановлювали наступним чином: швидкість потоку 0,2 мл/год, напруга, що подавалася на голку 17 кВ, швидкість обертання колектора (діаметром 10 см) становила 800 об/хв. Виготовлену мембрану сушили в вакуумі при кімнатній температурі протягом 12 годин.

В експерименті були використані *S. aureus* та *E. coli*, отримані з колекції бактерій Сумського державного університету. Усі бактеріологічні середовища були взяті з HiMedia (Махараштра, Індія), а Alamar Blue - від Invitrogen (Карлсбад, Каліфорнія, США). Для дослідження культури клітин усі середовища та реагенти були придбані у Gibco®, Gaithersburg, MD, США.

### **2.1.2 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)**

Зразки покривали тонким (30–50 нм шаро срібла у вакуумній установці ВУП-5М (SELMІ, Суми, Україна). Зображення губок SEM були спостережені FEI Inspect S50B (FEI, Брно, Чехія) за допомогою вторинного електронного детектора Еверхарта – Торнлі. Оцінку морфології нановолокна та аналізу волокнистої структури вимірювали на зображеннях SEM, використовуючи плагін DiameterJ 1.018w для Фіджі (розподіл ImageJ 1,51 w).

### **2.1.3 Пористість і щільність**

Витіснення ізопропанолу було використане для визначення пористості та щільності матеріалів хітозану. Зважені зразки поміщали у відомий об'єм ізопропанолу на 5 хвилин. Об'єм просочених зразків та решту ізопропанолу вимірювали після видалення гемостатичного матеріалу. Отримані дані використовувались для розрахунку щільності (рівняння (1)) та пористості (рівняння (2)):



$$d = W / (V2 - V3), \quad (1)$$

$$p = (V1 - V3) / (V2 - V3) \times 100\% \quad (2)$$

де:  $d$  – щільність, г/см<sup>3</sup>;

$p$  – пористість, %;

$W$  – вага зразка, г;

$V1$  – початковий об'єм ізопропанолу, см<sup>3</sup>;

$V2$  – об'єм ізопропанолу з зануреним зразком, см<sup>3</sup>;

$V3$  – об'єм ізопропанолу після вилучення зразка, см<sup>3</sup>.

#### 2.1.4 Дослідження деградації та біодеградації (in vitro)

Деградацію матеріалів (D) in vitro оцінювали в імітованій рідині тіла (SBF) з рН 7,4 та концентраціями іонів, приблизно рівними концентраціям у плазмі крові людини. Зважені зразки занурювали в стерильний розчин SBF на сім днів. Зразки виймали, промивали дистильованою водою, сушили і зважували кожні 12 годин. Дослідження біодеградації (B) проводили з людським лізоцимом - ферментом, що гідролізує  $\beta$ -глікозидні зв'язки. Лізоцим розчиняли у стерильному SBF до концентрації 10 мг/л при 37 °C для імітації природних умов. Зважені зразки занурювали в розчин лізоциму на сім днів. Хітозанові матеріали виймали, промивали дистильованою водою, сушили та зважували кожні 24 год. Деградацію та біодеградацію розраховували, використовуючи таке рівняння (3):

$$(B) D = (W0 - Wt) / W0 \times 100\% \quad (3)$$

де (B) D – ступінь (біо) деградації, %;

$W0$  – початкова вага аналізованого зразка, g;

$Wt$  – вага зразка через час  $t$ , хв.

### 2.1.5 Антибактеріальний тест

Антибактеріальні властивості зразків досліджували щодо грамнегативної кишкової палички (*E. coli*, В 926) та грампозитивного золотистого стафілокока (*S. aureus*, В 918). Культури бактерій інкубували в поживному бульйоні протягом 24 годин. Зразки (50 мг) готували в асептичних умовах і розміщали в стерильних пробірках з мікроорганізми, у концентрації, еквівалентній  $10^5$  колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл ( $5 \log_{10}$  КУО), суспендованій у 2 мл живильного бульйонного середовища. В якості негативного контролю використовували зразки без мікроорганізмів та бактерії, суспендовані у живильному бульйонному середовищі без зразків. Зразки та контролю інкубували протягом 2, 4, 6, 8, 10 та 24 год при 37 °С. Аліквоти по 100 мкл з пробірок висівали на поверхню поживного агару і потім культивували при 37 °С протягом 24 годин. Мікроорганізми підраховували у  $\log_{10}$ .

### 2.1.6 Аналіз цитотоксичності та Live/Dead фарбування

Колориметричний аналіз Alamar Blue та фарбування Live/Dead проводили для оцінки впливу гемостатичних матеріалів хітозану на життєздатність клітинних ліній U2OS. Клітинні лінії U2OS були отримані з Університету Умео (Швеція) і культивовані в модифікованій Дульбекко середовищі/поживній суміші Eagle F-12 (DMEM, Gibco, США), доповненій 10% фетальною бичачою сироваткою, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В (Gibco, США) за умови 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>. Клітини висівали в 24-лункові планшети при щільності  $2 \times 10^4$  клітин/лунку. Після 12 годин інкубації зразки хітозану (40 мг) додавали до клітин у кожній лунці. Через 24 години в кожну лунку додавали 100 мкл (10% обсягу середовища) розчину Alamar Blue. Для контролю використовували лунки, що містять лише клітини та середовище без зразків. Планшети інкубували протягом 4 год при 37 °С у темряві. 100 мкл середовища з кожної лунки переносили в інший 96-лунковий планшет, і поглинання вимірювали за допомогою зчитувача планшетів Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) при довжинах хвиль 570 і 600 нм.

Тест на Alamar Blue повторювали на 3-й та 7-й день з трьома повторами для кожного зразка.

Для фарбування Live/Dead ADSC виділяли з ліпоаспірату ферментативним розщепленням в 0,1% колагенази IA та 0,1% пронази з 2% фетальної бичачої сироватки (FBS) (Sigma-Aldrich, США) протягом 1 год при 37 °C. Експерименти із використанням культури клітин людини *in vitro* проводились відповідно до питань експериментів Кодексу етики Всесвітньої медичної асоціації (Гельсінська декларація). У всіх випадках добровільні інформовані згоди були підписані донорами ADSC. Отриману суспензію клітин переносили в матрас площею 25 см<sup>2</sup> (SPL, Корея) і культивували в наступному контрольному середовищі росту: модифікований MEM- $\alpha$  (Sigma-Aldrich, США) з 10% FBS (Sigma-Aldrich, США), 2 mM L-глутаміну, 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 1 нг/мл bFGF-2 (Sigma-Aldrich, США). Клітини культивували в інкубаторі CB210 (Binder, Німеччина) при 37 °C в атмосфері насиченої вологості, 5% CO<sub>2</sub> і 5% O<sub>2</sub>.

Для оцінки цитотоксичності клітини висівали зі щільністю  $2 \times 10^5$  клітин на 1 зразок. Через 2 дні (48 год) зразки фарбували PI (йодидом пропідію) (Sigma-Aldrich, США) та FDA (діацетат флуоресцеїну) (Sigma-Aldrich, США). Кількість загиблих та живих ADSC у різних групах підраховували за допомогою флуоресцентної мікроскопії (фільтри FITC та Texas Red; Carl Zeiss, Німеччина) та програмного забезпечення ZEN 2012.

### **2.1.7 Показники системи гемостазу *in vitro***

Хітозанові кровоспинні матеріали вагою 40 мг поміщали в Becton Dickinson Vacutainers® з 3,6 мг ЕДТА 2 мл. 40 мл цільної людської цільної крові (WhB) було отримано від двох добровольців медсестрою в Медичному інституті Сумського державного університету. Дослідження було попередньо схвалено Комітетом з етики Сумського державного університету, відповідна поінформована згода була отримана від усіх добровольців. Кров додавали в кожну пробірку. Вакутейнери струшували протягом 10 хвилин, а всі зразки

виймали та зважували. Швидкість сорбції крові (BS) розраховували наступним чином (4):

$$BS = W2 - W1 \quad (4)$$

де  $W1$  – початкова вага (40 мг);

$W2$  – вага після взаємодії з кров'ю, мг.

Загальний аналіз крові (ЗАК) проводили на гематологічному аналізаторі CELL-DYN 3700 (ABBOTT, Ірвінг, Техас, США) з використанням реагентів DIAGON (Будапешт, Угорщина). Оцінювали кількість тромбоцитів (КТ,  $\times 10^9/\text{л}$ ), ширину розподілу тромбоцитів (ШРТ, %) та середній об'єм тромбоцитів (СОТ, fL). В якості контролю використовували необроблену кров.

Після зважування зразки фіксували у 2% глутаральдегіді протягом 2 год, потім його зневоднювали в етанолі. Всі зразки після висихання покривали шаром срібла (30-50 нм) для SEM.

### **2.1.8 Експеримент на тваринах**

Для оцінки ефективності матеріалів на основі Ch використовували шістдесят 24-тижневих лабораторних щурів-самців з масою тіла 250–300 г. Тварин розміщували при  $22 \pm 2$  °C протягом 12-годинного циклу світло/темрява з доступом до їжі та води за необхідності. Щурів розділили на три групи по 20 тварин у кожній. Наступні гемостатичні матеріали були розділені на групи: Tachocomb® (Takeda Austria GmbH) як стандартне лікування, ChAG, ChSp та ChEsM. Утримання тварин та всі експериментальні процедури проводились відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовується для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.); Директива 2010/63/ЄС Європейського Парламенту та Ради про захист тварин, що використовуються в наукових цілях (2010 р.). Процедури були затверджені Комітетом з етики Сумського державного університету.

Тварин знеболювали шляхом внутрішньочеревної ін'єкції 7 мг/кг кетаміну (АТ «Фармак», Україна) та 10 мг/кг ксилазину (Alfasan International B.V, Нідерланди). Лапаротомію середньої лінії 2 см проводили в стерильних умовах. Для імітації кровотечі з рани на діафрагмальній поверхні лівої медіальної частини печінки повної товщини була проведена повністю проникаюча 4-мм ударна біопсія. Гемостатичний матеріал негайно застосовували для заповнення дефекту печінки (рис. 2.1). Час кровотечі оцінювали після нанесення гемостатичного матеріалу. Рана живота була закрита двома шарами розсмоктуючих швів.

Тварини були евтаназовані передозуванням кетаміном (100 мг/кг) на 7, 30 та 60 дні після операції. Уражену ділянку печінки з навколишніми тканинами видаляли і піддавали гістологічному дослідженню.

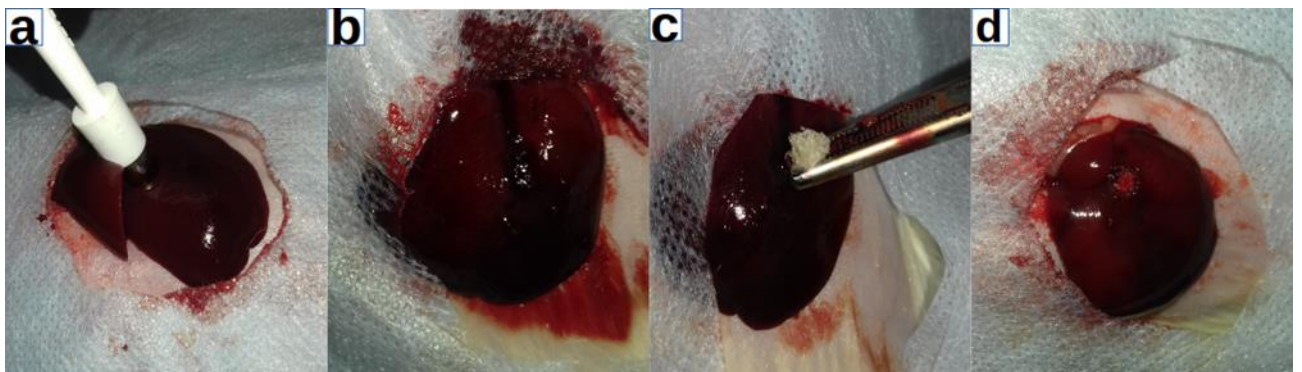


Рисунок 2.1 – Процедура біопсії перфорацією печінки (а), печінкової кровотечі (b), гемостатичного застосування (c) та зупиненої кровотечі (d)

### 2.1.9 Гістологічні та імуногістохімічні дослідження

Тканини печінки фіксували в 10% нейтральному забуференому формаліні протягом 24 годин і обробляли в автоматизованому гістопроесорі (Milestone LOGOS Hybrid Tissue Processor, Milestone, Італія). Блоки, вкладені в парафін, вирізали товщиною 4 мкм (мікротом Thermo Scientific HM 340E). Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином, використовуючи Dako Cover Stainer (Agilent, США) для рутинної гістологічної оцінки. Крім того, використовували

гістохімічне фарбування: фарбування толуїдиновим синім для візуалізації опасистих клітин, фарбування толуїдиновим синім для диференційованих колагенових волокон та фарбування Гоморі для візуалізації ретикулярних волокон.

Гістологічний аналіз включав оцінку ремоделювання тканин, поступової деградації матеріалу, вогнищевої проліферації та реакції клітинних елементів, відповідальних за деградацію в місці резекції з часом. Оцінку запальної інфільтрації проводили на різних термінах дослідження, використовуючи систему напівкількісних балів. Оцінювали кожну пробу в 5 точках у гемостатичному матеріалі та навколо нього при великому збільшенні відповідно до ISO 10993-6 "Біологічна оцінка біомедичних зразків, частина 6 – тест на місцеві ефекти після імплантації".

Імуногістохімія проводилася згідно стандартного протоколу. Тканини депарафінізували та гідратували, а активність ендогенної пероксидази блокували, використовуючи 3% метанол у пероксиді водню. Далі проводили пошук антигену на водяній бані при 98 °C за допомогою TRIS EDTA або цитратного буфера (pH 6) з подальшою інкубацією з первинними антитілами. Після промивання додавали мічене вторинне антитіло (Envision Detection System, Dako). Активність пероксидази визначали за допомогою діамінобензидину (DAB) - тетрагідрохлоридної рідини та субстрату системи хромогену (Dako). Реакцію зупиняли дистильованою водою, зрізи фарбували гематоксиліном і встановлювали в монтажному середовищі Річарда-Аллана (ThermoFisher). Для візуалізації макрофагів використовували наступні антитіла: CD68 (DAKO, Клон KP1) та CD163 (Cell Marque, Клон MRQ-26) та Ki-67 (DAKO, Клон MIB-1) для оцінки проліферації клітин.

### **2.1.10 Статистична обробка даних**

Результати представлялися як середнє значення±стандартні відхилення. Дві групи порівнювали за допомогою t-критерію. Коли порівнювали більше двох груп, вводили ANOVA.  $p < 0,05$  вважали статистично значущим. Статистичний

аналіз проводили за допомогою GraphPad Prism 8.0. та IDE Rstudio (версія 1.2.5033) для програмного пакету R (версія 3.4.4) (з <http://www.rstudio.org> та <https://www.R-project.org>).

## **2.2 Результати дослідження властивостей хітозанових мембран та хітозанових губок**

### **2.2.1 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)**

Матеріали на основі Ch демонстрували адекватну пористість з різними структурами залежно від способу виготовлення (рис. 2.2). ChSp виготовляли з пластівців різної форми, які оточують пори з медіаною площі пор  $164 \text{ мкм}^2$  (IQR 47-767). Великі відкриті пори можуть прискорити поглинання рідини, яка необхідна для гемостатичних матеріалів. Пластини ChSp мали звивисту поверхню, що додатково збільшувало ефективну площу контакту. На противагу ChSp ChEsM був виготовлений з випадково орієнтованих волокон із середньою товщиною 160 нм (IQR від 86 до 236). Деякі дослідження продемонстрували, що випадково орієнтовані волокна демонструють прогресивний потенціал регенерації тканин завдяки подібності із позаклітинним матриксом [43-44]. Вважається, що нанодіаметр волокна сприяє швидшій біодеградації ChEsM [45]. На відміну від ChSp, середня площа пор ChEsM становила  $0,06 \text{ мкм}^2$  (IQR 0,02-0,16). Однорідність волокон та пор може передбачати рівну взаємодію з клітинами крові із збільшенням гемостатичної здатності.

### **2.2.2 Пористість і щільність**

Вимірювання витісненої частки ізопропанолу (рис. 2.3. а, с) показали, що ChEsM мав значно вищу пористість  $77\pm 3\%$  проти ChSp  $71\pm 5\%$  ( $p < 0,001$ ). Менша пористість губок, ймовірно, зумовлена великою кількістю закритих пір. Щільність матеріалів на основі хітозану була значно нижчою ( $p < 0,05$ ) для ChEsM  $0,08\pm 0,07 \text{ г/см}^3$ , тоді як для ChSp вона становила  $0,089\pm 0,05 \text{ г/см}^3$ . Маса матеріалу, що використовується для створення одиниці

об'єму гемостатичного матеріалу, в першу чергу залежить від способу синтезу, а також властивостей полімеру. Щільність гемостатику додає скелетну функцію, необхідну при тампонаді рани [46]. Але після зупинки кровотечі щільно упакована губка повільніше розсмоктується [47].

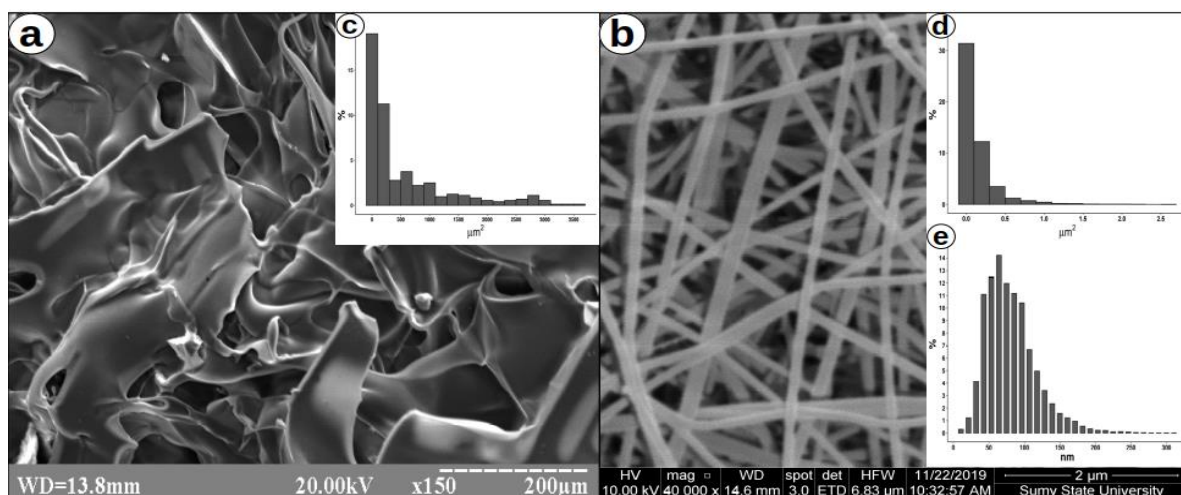


Рисунок 2.2 – Скануюче електронно-мікроскопічне зображення ChSp (a) з аналізом площі пор (c), структури (b), площі пор (e) та діаметр волокна (d) ChEsM

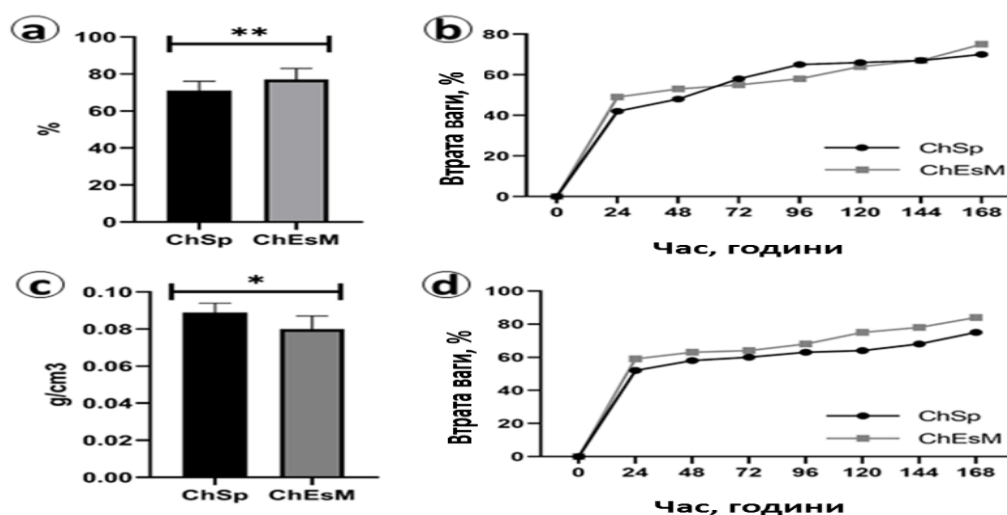


Рисунок 2.3 – Пористість (a), щільність (c), розпад у SBF (b) та біодеградація в розчині лізоциму (d) гемостатичних матеріалів



### 2.2.3 Дослідження деградації та біодеградації (in vitro)

Дослідження деградації показали, що обидва матеріали швидко втрачали вагу в SBF та розчині лізоциму (рисунок 2.3 b, d). Протягом перших 2 днів дослідження рівень деградації був вищим для ChEsM і досяг 53%. На 3 та 4 день деградація ChEsM стала повільнішою, однак вона була значно ( $p < 0,05$ ) більшою, ніж ChSp (65% проти 58%). У наступні два дні швидкість деградації ChSp стабілізувалась і наприкінці дослідження (день 7) досягла 70%. З іншого боку, деградація ChEsM поступово прискорювалася і досягала 75%, що було значно вищим ( $p < 0,05$ ) порівняно з ChSp.

Біодеградація в розчині лізоциму дещо відрізнялася від деградації в розчині FBS. Примітно, що в перший день дослідження втрата ваги в лізоцимі була на 10% вищою для обох зразків порівняно з розчином FBS. Ферментативне розщеплення ChSp було більш рівномірним і на 7 день досягло 75% втрати ваги. Навпаки, спостерігалось прискорення швидкості біодеградації ChEsM з 5-го дня ( $p < 0,05$ ), що призвело до 84% втрати ваги в кінці дослідження. Для місцевих гемостатичних матеріалів важливим є баланс ефективності та швидкості деградації [23]. Занадто швидка деградація збільшує ризик повторної кровотечі, занадто тривала деградація може порушити регенерацію органів [48].

### 2.2.4 Антибактеріальний тест

Існує загальний ризик зараження рани під час кровотечі через відсутність захисних бар'єрів в організмі. Гемостатичні матеріали, такі як губки, повинні мати антибактеріальні властивості, щоб зменшити ризик системної інфекції [49]. Дві репрезентативні бактерії (*S. aureus* та *E. coli*) використовувались для аналізу потенційної антибактеріальної активності губок та мембран. Криві росту обох штамів після інкубації з ChEsM та ChSp протягом 24 год показані на рисунку 2.4. Через 2 години активний ріст мікроорганізмів був відзначений для зразків ChEsM. Кількість мікробних колоній дорівнювала позитивному контролю через 6 год для *E. coli* та 8 год для *S. aureus*. 24-годинне дослідження інгібуючої активності показало слабкий антибактеріальний

ефект ChEsM щодо обох патогенів, що вказує на те, що модифікація хітозану методом електроспінінгу не покращила його антибактеріальну активність. ChSp показав вищу протимікробну активність у порівнянні з ChEsM (більш виражену щодо грам-негативних бактерій). Зразок ChSp проявляв антимікробну дію в відношенні обох штамів в протягом 6 годин. Проте після 8 годин спільного культивування з цими зразками КУО/мл відповідали даним позитивного контролю. Його нижча швидкість деградації може пояснити більш тривалий інгібуючий ефект ChSp на відміну від ChEsM [50]. Отже, губка ChSp може бути застосована для запобігання росту бактерій у перші години після операції через її явний бактеріостатичний ефект на ранніх етапах аналізу *in vitro*.

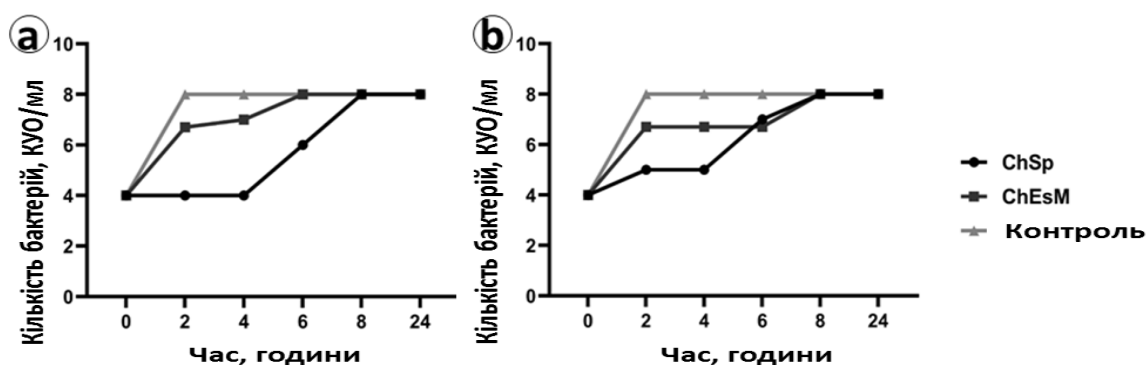


Рисунок 2.4 – Кількість бактеріальних клітин, індукованих ChSp та ChEsM на *S. aureus* та *E. coli*

### 2.2.5 Аналіз цитотоксичності та Live/Dead фарбування

Обидва гемостатичні матеріали показали свою нетоксичність після 48 годин культивування та Live/Dead фарбування за допомогою FDA/PI (рис. 2.5. а, б). Клітини були добре прикріплені і рівномірно розподілені на поверхні зразків.

Аналіз зниження рівня резазурину (рис. 2.5 с, d) продемонстрував достовірно ( $p < 0,05$ ) кращу адгезію клітин у перший день для ChEsM. Адгезійні властивості необхідні як для швидкого гемостазу, так і для прискорення запуску процесів регенерації. ChEsM має значно ( $p < 0,05$ ) більш високу клітинну проліферацію на своїй поверхні як на 3-й день і 7-й день

культивування. Структура мембрани сприяла зростанню клітин на її поверхні та проникненню клітин у глибші шари. Це важливо для повної біодеградації гемостатичного матеріалу та відновлення пошкодженого органу.

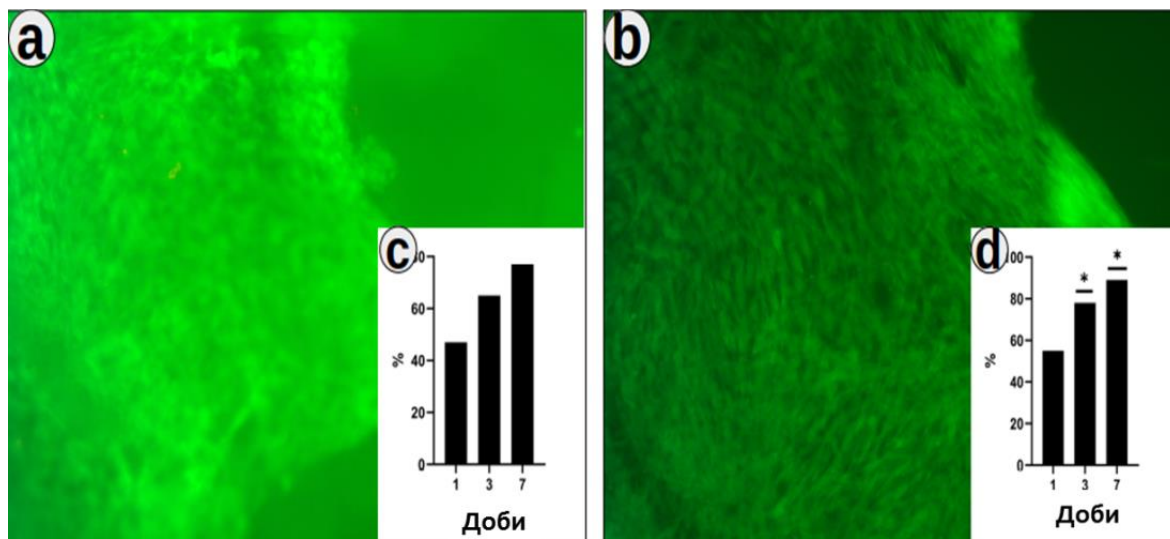


Рисунок 2.5 – ChSp (a), ChEsM (b) фарбування FDA/PI через 48 годин культивування клітин та життєздатність клітин ChSp (c), ChEsM (d) з використанням аналізу відновлення резазурину

### 2.2.6 Тест на взаємодію з кров'ю

Після взаємодії з цільною кров'ю обидва матеріали адгезували на своїй поверхні значу кількість клітин крові (рис. 2.6). ChSp мав більші показники сорбції крові ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ChEsM. Обидва гемостатичні матеріали значно ( $p < 0,05$ ) знижували кількість тромбоцитів без різниці між групами. Хітозанові гемостатики не виявили різниці ( $p > 0,05$ ) для ширини розподілу тромбоцитів та середнього об'єму тромбоцитів, хоча була значна ( $p < 0,05$ ) різниця з контролем. Ці гематологічні параметри можуть свідчити про активацію тромбоцитів, яка є важливим компонентом першої фази гемостазу [51].

### 2.2.7 Експеримент на тваринах

Під час гемостатичного дослідження жодна тварина не загинула. Експериментальні групи між собою суттєво не відрізнялись за віком

вагою, втратою крові до дослідження або вагою пошкодженої печінки. У щурів не виявлено порушень гемодинаміки або погіршення поведінкової реакції. Очевидної різниці в часі кровотечі не спостерігалось ( $p > 0,05$ ). ChSp повністю зупинив кровотечу на  $80,6 \pm 5,7$  с. а для часу ChEsM повний гемостаз становив  $84,5 \pm 4,8$  с. Повторне застосування гемостатичних засобів не було необхідним ні в якому випадку.

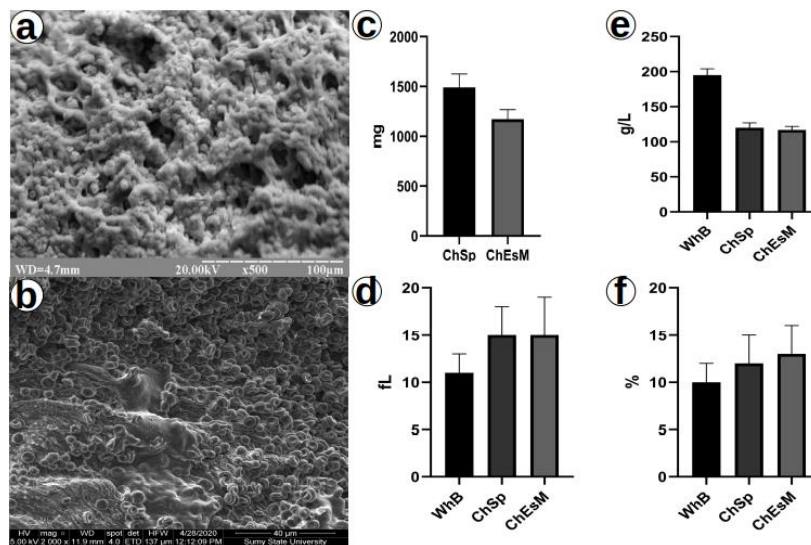


Рисунок 2.6 – SEM ChSp (a), ChEsM (b) та гематологічні параметри: кількість тромбоцитів (e), середній об'єм тромбоцитів (f) та ширина розподілу тромбоцитів (d) після взаємодії з кров'ю

### 2.2.8 Гістологічні та імуногістохімічні дослідження

Через тиждень після хірургічного втручання та застосування біоматеріалів гістологічний аналіз виявив, що обидва гемостатичні засоби добре адаптовані до дефекту печінки. Матеріали заповнювали порожнини, зроблені під час перфораційної біопсії, і були відділені від тканин печінки товстою капсулою з незрілої сполучної тканини, багатою численними клітинами. Важливо, що пошкодження печінки та застосування матеріалів супроводжувались запальною реакцією, яка відрізнялася за інтенсивністю та клітинним складом залежно від застосовуваного біоматеріалу. Крім того, особливості активної регенерації були

виявлені на межі з навколишніми тканинами печінки через тиждень після операції.

Оцінюючи динаміку біодеградації зразків *in vivo*, ми виявили, що незважаючи на однаковий розмір імплантованих матеріалів на ранніх термінах після операції ( $p=0,123$  за 1 тиждень), діаметр ChEsM поступово зменшувався на 4 ( $p=0,005$ ) та 8 тижні ( $p=0,0001$ ) порівняно з ChSp. Як результат, наприкінці експерименту діаметр ChEsM був приблизно вдвічі меншим за початковий розмір (рис. 2.7). На відміну від цього, темпи біодеградації ChSp були набагато повільнішими.

Відповідно, розмір печінки мав подібні характеристики. Хоча ChSp залишався незмінним протягом 1-го місяця після операції, щури із застосуванням ChEsM продемонстрували поступове зменшення дефекту тканини печінки. Це було пов'язано з витонченням капсули навколо ChEsM (рис. 2.7 c) та прогресивним вrostанням тканин в межі зразка ( $p=0,014$  на 4 тижні та  $p=0,002$  на 8 тижні). Менш явним було скорочення дефекту печінки у щурів із застосуванням ChSp, яке корелювало із вrostанням тканин у гемостатичну губку. Варто зазначити, що різновиди в структурі біоматеріалів впливали на взаємодію з клітинами хазяїна. На додаток до вrostання сполучної тканини (рис. 2.7 d) та наявності численних макрофагів в обох групах, зразок ChEsM створив основу для адгезії клітин. З 1-го тижня після хірургічного втручання на мембранах були відмічені особливості у вигляді вистилання клітинних шарів.

Відмінності в товщині матеріалу та взаємодії з клітинами та тканинами хазяїна були помітні. Хоча ChSp мав нерегулярну товщину, ChEsM розташовувались у тонкомембранних правильних напрямках (рис. 2.8). Через 2 місяці після резекції печінки повільна деградація ChSp була пов'язана з агрегацією матеріалу, оточеною гігантськими клітинами сторонніх тіл. У випадку ChEsM мембрани занурюються у тканини господаря, які врастають в залишки біоматеріалу.

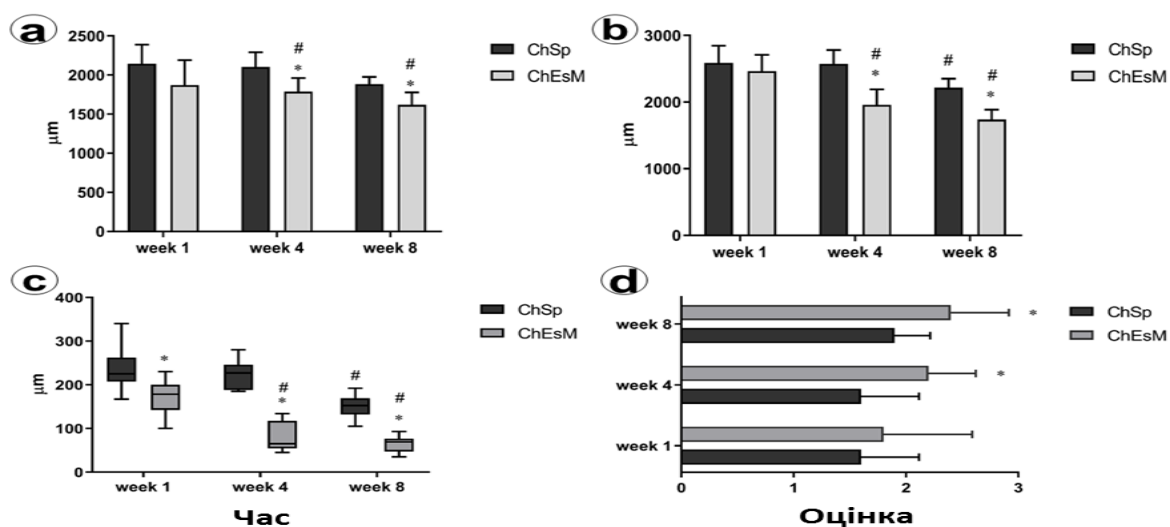


Рисунок 2.7 – Динамічні зміни розміру ураження печінки та деградації біоматеріалів: а - показує динаміку гемостатичних можливостей та б - відображає зміни розміру дефектів печінки за час експерименту; с - товщина капсули, що оточує кровоспинні матеріали; d - вrostання тканин господаря в гемо статичний матеріал. \* показує достовірні відмінності між групами при  $z < 0,05$ , # - відмінності при порівнянні з попереднім терміном.

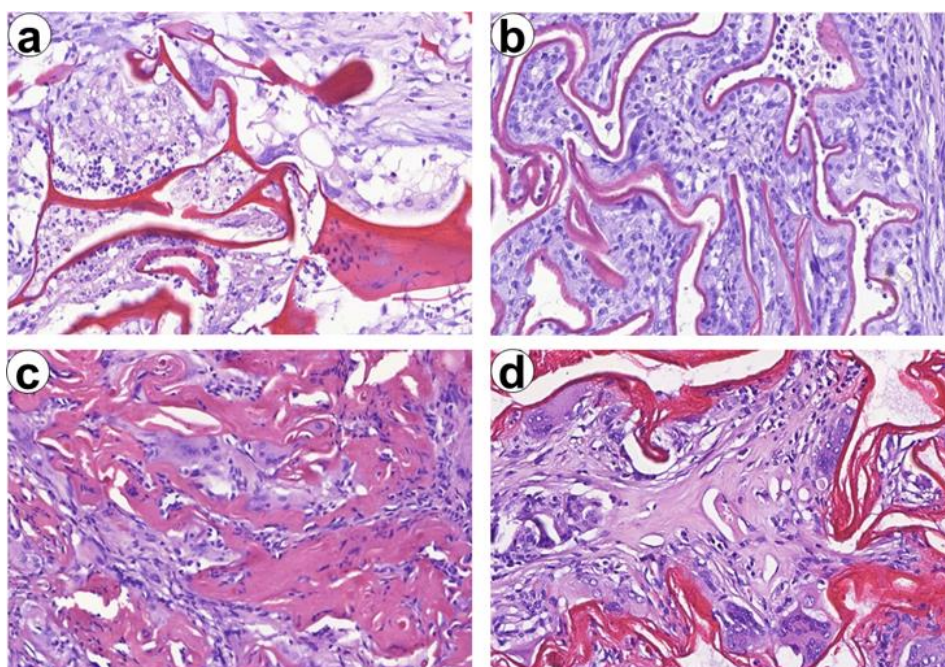


Рисунок 2.8 – Відмінності в деградації матеріалів на основі Ch та біосумісність на різних термінах після операції (а та б демонструють гемостатичні матеріали ChSp та ChEsM відповідно на ранніх стадіях після операції через тиждень; с і d вказують на ті самі матеріали через 2 місяці після травми печінки)

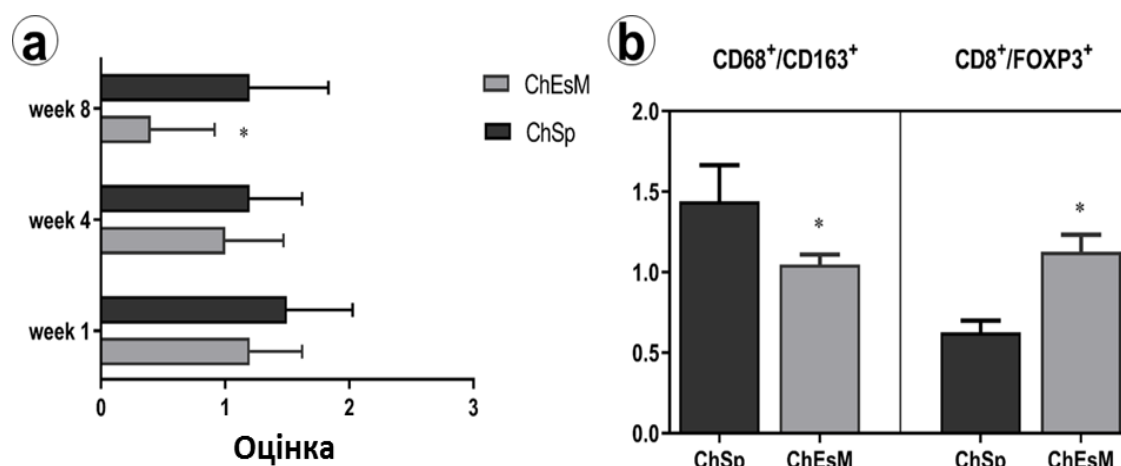


Рисунок 2.9 – Запальна реакція та співвідношення імунних клітин в капсулі, що оточує кровоспинні агенти. а - демонструє оцінку запальної інфільтрації в капсулі, що оточує кровоспинні матеріали, та відділення їх від тканин печінки. б - показує відмінності у M1/M2-макрофагах та співвідношенні підтипів лімфоцитів CD8/FOXP3 у капсулі навколо ChSp та ChEsM

Запалення в капсулі було пов'язано з залученням макрофагів M1 та M2. Макрофаги M2-типу були численні в периваскулярних зонах і на зовнішньому шарі капсули (рис.2.10). Також у капсулі були виявлені клітини CD8 та FOXP3. Ми не виявили суттєвих відмінностей у кількості підтипів макрофагів та лімфоцитів. Однак співвідношення CD68/CD163 було зміщено в бік макрофагів M2 в групі ChEsM, тоді як у ChSp було викликано незначний Treg-switch. Ці висновки можуть відображати відмінності в реакціях імунних клітин на різні модифіковані матеріали на основі хітозану. Незважаючи на відсутність суттєвих відмінностей в оцінці запальної реакції (рис. 2.10 а) на ранніх термінах після операції, на 8-му тижні експерименту група ChEsM продемонструвала зниження запалення та кращу регенерацію печінки. Хоча абсолютна кількість макрофагів і лімфоцитів не продемонструвала відмінностей між групами, існували деякі особливості між M1/M2-макрофагами та балансом підтипів лімфоцитів CD8/FOXP3.

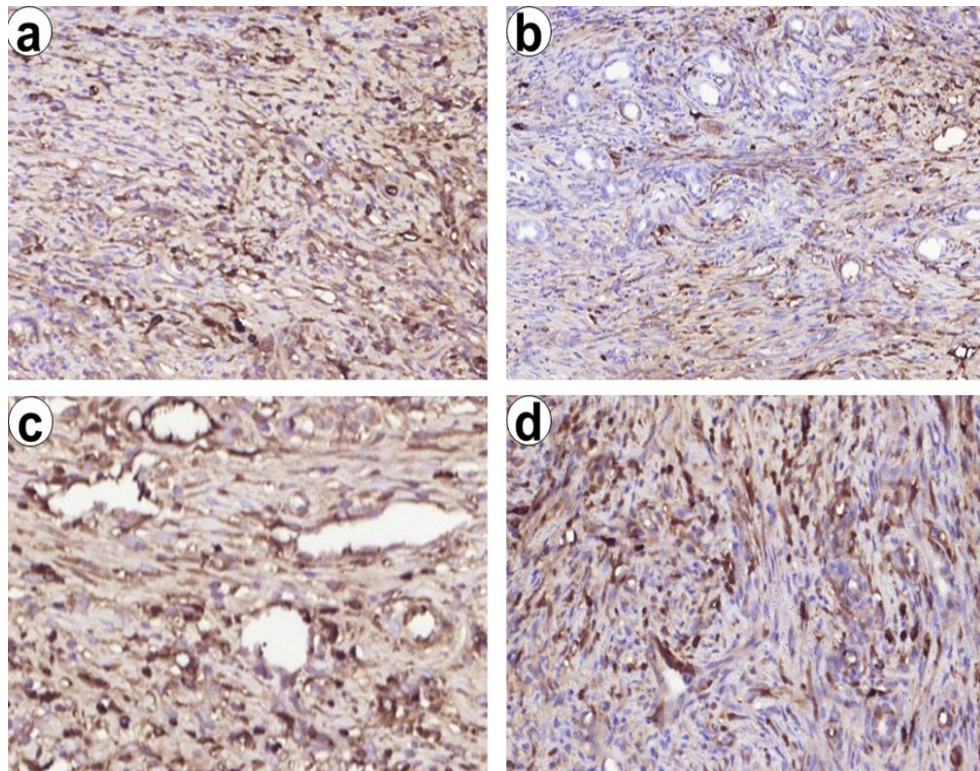


Рисунок 2.10 – Інфільтрація капсули, що оточує матеріали на основі хітозану, макрофагами CD68+ та CD163+ (а та б) та лімфоцитами (с та d) через 7 днів після гемостазу

Імуногістохімічне дослідження. а - численні дифузно розповсюджені клітини CD68+ в капсулі, що оточує дефект печінки, заповнений гемостатичним матеріалом. б - клітини CD163+, що зосереджуються переважно навколо судин та холангіол, що відображає їх зв'язок із репарацією. с і d - лімфоцити CD8+ і FOXP3+ в капсулі, що оточує дефект печінки, заповнений гемостатичним матеріалом.

Вивчаючи потенційні механізми, що відповідають за покращення біоактивних властивостей ChEsM, ми порівняли кількість імунних клітин (макрофаги M1/M2 та CD8 проти лімфоцитів FOXP3) в капсулі, яка відмежовує матеріал від печінки та відображає реакцію господаря на цей матеріал. Існують суперечливі дані про вплив хітозану та його похідних на активацію та поляризацію макрофагів. Морі Т. та співавт. [52] показали, що хітозан активує макрофаги, однак він може викликати їх апоптоз у відповідь на фагоцитоз. З іншого боку, було визначено поширеність поляризації M2-макрофагів



після застосування матеріалів на основі Ch, хоча була продемонстрована роль зразків різного ступеня ацетилювання у поляризації макрофагів [53].

У нашому дослідженні ми виявили реакцію макрофагів M1 та M2 у групах ChSp та ChEsM. Незважаючи на відсутність суттєвих відмінностей у абсолютній кількості, у групі ChEsM відбувся перехід до макрофагів M2. M2-макрофаги відомі як протизапальні фенотипи, що виробляють широкий спектр факторів росту і відіграють життєво важливу роль у припиненні запалення, ангиогенезі та відновленні тканин [54]. Важливо, що клітини CD163+ переважали, були розташовані навколо місць гепатоцелюлярної регенерації та ангиогенезу, що могло б пояснити прогресивний ріст тканин та відновлення уражень у групі ChEsM.

Крім того, присутність PEO в ChEsM може впливати на реакцію адаптивних імунних клітин, індукуючи апоптоз лімфоцитів та диференційовано модулюючи активність різних лімфоцитів [55]. Тут ми виявили зміщення співвідношення CD8/FOXP3 у бік лімфоцитів T-reg в капсулі групи ChSp, що може бути компенсаторним механізмом пригнічення запальної реакції проти ChSp, оскільки вони виробляють численні протизапальні медіатори, важливі для відновлення тканин [56]. Також відомо, що клітини FOXP3 відповідають за імунну толерантність і запобігають аутоімунним реакціям [57-58].

З іншого боку, збільшена кількість клітин T-reg може бути пов'язана з фіброзними змінами [59]. Однак, щоб виявити імунну структуру при застосуванні матеріалів на основі Ch та взаємодії матеріалу та імунітету, необхідні подальші дослідження.

Порівняння гістологічних змін у групах ChSp та ChEsM показало, що модифікація хітозану в наномасштабі може значно покращити його біоактивні властивості та регенерацію тканини хазяїна. ChESM мав нижчу імуногенність та вищу біосумісність, як клітинний субстрат, що полегшує адгезію клітин хазяїна та прогресивний ріст тканин. Прискорена біодеградація ChEsM була пов'язана з вдосконаленою репарацією уражень печінки.

## 2.3 Результати дослідження властивостей хітозанових мембран та хітозанових аерогелів

### 2.3.1 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)

ChAG продемонстрував складну пористу структуру (рис. 2.11 а) із середньою площею пор  $414 \pm 41 \text{ мкм}^2$ . Відносно рівномірний розподіл пор (рис. 2.11 в) у мікронному вимірі дозволяє швидко всмоктувати кров. Однак ChAG продемонстрував низьке відношення поверхні/об'єму, що може обмежити взаємодію ChAG/клітин крові. На відміну від цього, ChEsM мав нановолокнисту архітектуру (рис. 2.11 б) випадково орієнтованих волокон діаметром  $180 \pm 14 \text{ нм}$  (максимальна товщина -  $353 \pm 17 \text{ нм}$ ) (рис. 2.11 д). Зв'язані між собою пори між волокнами, що перетинаються, були невеликими, площею  $0,16 \pm 0,013 \text{ мкм}^2$  і не перевищували  $1 \text{ мкм}^2$  (рис. 2.11 д). Така структура значно збільшила активну поверхню для кращої адгезії клітин та сорбції крові.

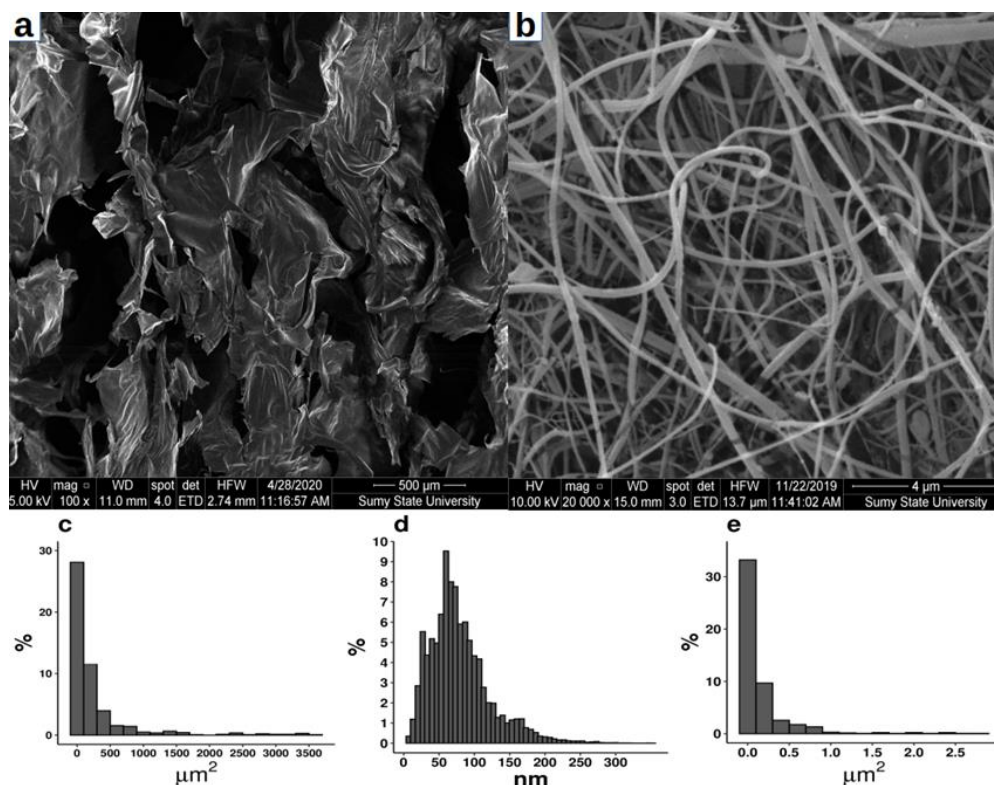


Рисунок 2.11 – Скануюче електронно-мікроскопічне зображення ChAG (а) з аналізом площі пор (с). Структура (б), площа пор (е) та діаметр волокна (д)

ChEsM

### 2.3.2 Пористість і щільність

Усі матеріали продемонстрували високу пористість, яка досягала 80% без суттєвих відмінностей (рисунок 2.11 а, b), що має велике значення для гемостатичних показників, оскільки гарантує кращу сорбцію крові. Крім того, обидва гемостатичні матеріали мали дуже низьку щільність. Але ChEsM показав значно вищу щільність порівняно з ChAG ( $p < 0,05$ ). Обидва параметри залежать від технологічного процесу виготовлення матеріалу - ліофілізації або електроспінінгу. Важливо те, що низька щільність може призвести до швидшої біодеградації біоматеріалів після зупинки кровотечі.

### 2.3.3 Дослідження деградації та біодеградації (in vitro)

Рисунки 2.12 с і d демонструють, що обидва гемостатичні агенти хітозану мали подібну динаміку деградації в розчині SBF із швидким первинним зниженням до 40% (ChAG) або 50% (ChEsM) своєї ваги протягом перших 24 годин і сповільненою деградацією під час наступних днів. Однак темпи деградації ChEsM були вищими ( $p > 0,05$ ), досягнувши 75% ваги, втраченої на 7-й день, тоді як ChAG продемонстрував лише 65% втрати маси ( $p < 0,05$ ).

Занурення зразків у лізоцим показало набагато вищі темпи втрати ваги порівняно з SBF, що може бути пов'язано зі специфічною ферментативною деградацією хітозану. Обидва гемостатичні матеріали втратили більше 50% від початкової ваги протягом перших 24 годин. подальша біологічна деградація призвела до додаткової втрати ваги до 75% для ChAG та понад 82% для ChEsM ( $p < 0,05$ ). Помірний темп деградації є важливим у двох аспектах. З одного боку, матеріал не повинен розкладатися занадто швидко, оскільки швидка резорбція збільшує ризик повторного кровотечі. З іншого боку, занадто тривала деградація може призвести до капсулювання та порушення відновлення органів.

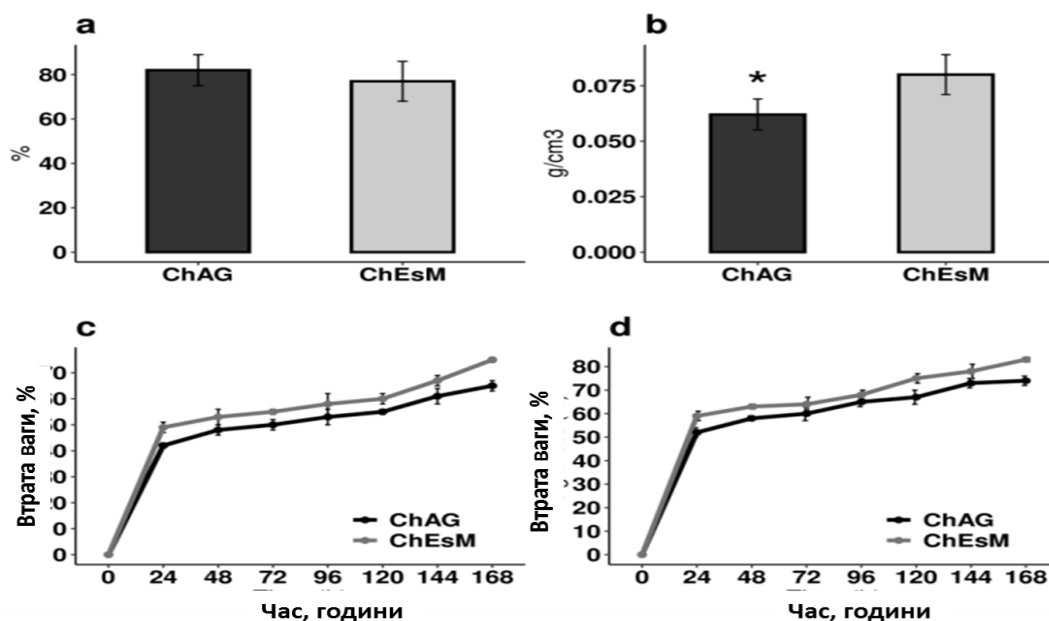


Рисунок 2.12 – Пористість (а) та щільність (б) гемостатичних матеріалів; динаміка деградації в SBF (с) та біодеградація в розчині лізоциму (д)

### 2.3.4 Антибактеріальний тест

Рисунок 2.13 ілюструє антибактеріальну дію матеріалів на основі Ch проти *E. coli* та *S. aureus*, які оцінювали підрахунком кількості колоній після різного часу інкубації. Наші результати показали низьку інгібуючу здатність зразків ChEsM проти *S. aureus* та *E. coli*. Однак кількість мікробних колоній в пробірках з ChEsM була нижчою, ніж у позитивному контролі протягом перших шести годин інкубації. На противагу цьому, ChAG виявляв значно вищу антибактеріальну активність. Ми виявили, що ChAG проявляв тривалу антибактеріальну активність проти кишкової палички, що призводило до повного пригнічення росту через 24 години інкубації. Антимікробна дія ChAG проти *S. aureus* була різною і демонструвала значне гальмування протягом перших 2 годин. Однак наступний період був пов'язаний зі збільшенням росту бактерій. Загалом ChAG був більш ефективним проти грамнегативних бактерій, а ніж грампозитивних мікробів.

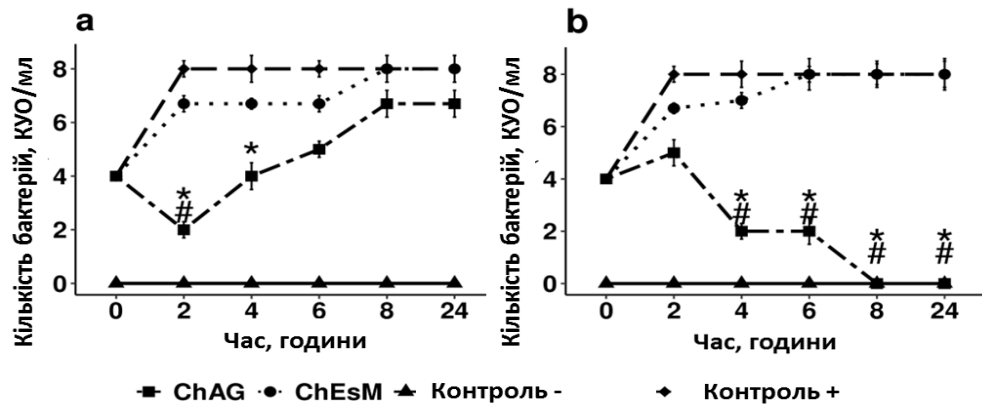


Рисунок 2.13 – Кінетика кількості бактеріальних клітин, індукованих ChAG та ChEsM: *S. aureus* (a) та *E. coli* (b); # вказує на значення  $p$  між групами аерогелю та електроспінінгових мембран ( $<0,05$ ); \* позначає значення  $p$  між групами ChAG та ChEsM та позитивним контролем ( $<0,05$ ).

### 2.3.5 Експеримент на культурах клітин

Аналіз відновлення резазурину (рисунок 2.14 б) продемонстрував однакову адгезію клітин до обох біоматеріалів у перший день дослідження та збільшення кількості клітин з 3-го дня культивування. Тим не менше, швидкість редукції резазурину на ChEsM була значно вищою ( $p<0,05$ ) на 3 та 7 день, що відображає підвищену проліферацію клітин.

Через 48 годин культивування клітин, Live/Dead фарбування за допомогою FDA та PI показало, що більшість клітин прикріпилися і почали розмножуватися (рисунок 2.14 а). Поверхня ChEsM містила більше клітин, тоді як ChAG мала неправильну 3D-структуру з меншою кількістю прикріплених клітин.

Вища життєздатність клітин при інкубації з ChEsM порівняно з ChAG може бути пов'язана як з кращою біосумісністю матеріалу, так і/або меншою цитотоксичністю. Вирігідно, волокниста архітектура ChEsM сприяла адгезії та проліферації клітин, отже вона могла б служити конструкцією тканини для поліпшення відновлення печінки після операції.

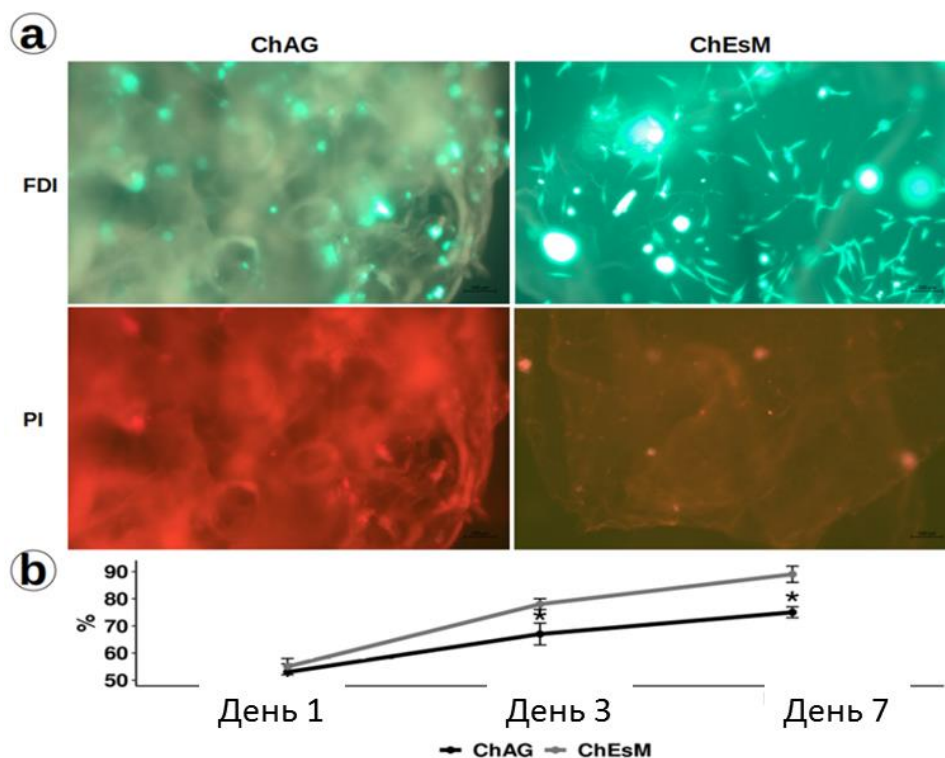


Рисунок 2.14 – а)-Live/Dead фарбування FDA та PI через 48 годин культивування клітин; б) - Життєздатність клітин визначена за допомогою аналізу редукування резазурину. \* зірочками вказується значення р між аерогелем та електроспінінговими мембранами (<0,05).

### 2.3.6 Показники системи гемостазу *in vitro*

На рис. 2.15 а та б показано SEM взаємодії крові з гемостатичними матеріалами. На поверхні обох агентів були великі скупчення еритроцитів і тромбоцитів - активовані тромбоцити утворювали щільну сітку з фібриновими волокнами. Еритроцити були міцно прикріплені до відкладень фібрину. Крім того, були прямі контакти клітин крові з електроспінінговими волокнами, що може відображати електростатичну взаємодію з еритроцитами та стимуляцію тромбоцитів.

ChAG мав значно вищі ( $p < 0,05$ ) сорбційні властивості - він може поглинати вагу плазми крові, в 25 разів перевищуючи власну. Обидва матеріали на основі Ch демонстрували помітну адгезивність до тромбоцитів, що призводило до значного зменшення кількості тромбоцитів ( $p < 0,05$ ) при взаємодії з кров'ю (рис. 2.15 а). Також взаємодія з матеріалами на основі Ch змінила функціональні

параметри тромбоцитів, що відображає їх активацію. Контакт з обома матеріалами хітозану призвів до значного збільшення кількості тромбоцитів у порівнянні з цільною кров'ю (рис. 2.15 b, c). Зміна форми та збільшення об'єму тромбоцитів свідчить про їх активацію як важливий крок для зупинки кровотечі.

### 2.3.7 Експеримент на тваринах

Найкоротший час кровотечі був у групи повного гемостазу, індукованого тахокомбом, протягом  $78,8 \pm 5,79$  с. ChAG повністю зупинив кровотечу на  $81,33 \pm 5,48$  с. Середній час завершення зупинки кровотечі для ChEsM становив  $84,53 \pm 4,88$  с. Суттєвих відмінностей між групами не було ( $p > 0,05$ ). Жодна з тварин не потребувала додаткового застосування гемостатичних засобів.

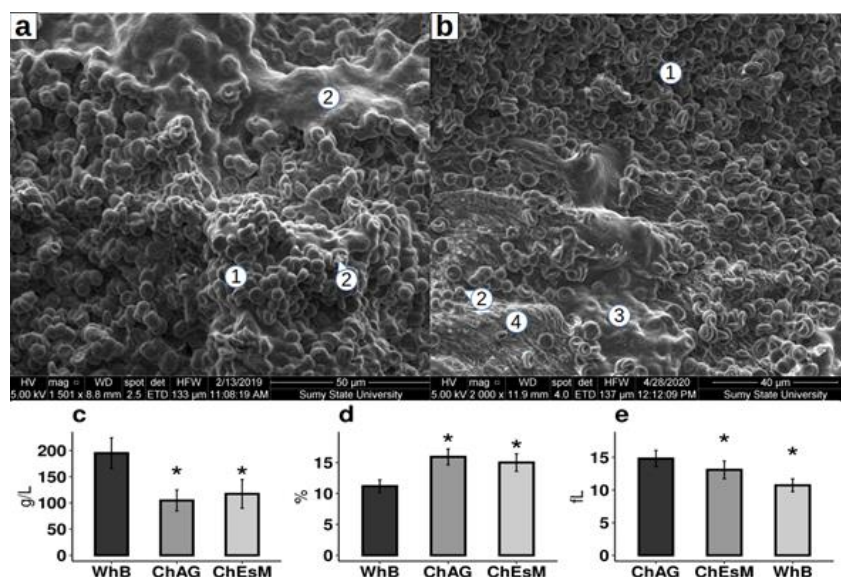


Рисунок 2.15 – SEM ChAG (a) та ChEsM (b), що взаємодіють з кров'ю: еритроцити (1), тромбоцити (2), відкладення фібрину (3) та клітинна мембрана (4). Взаємодія крові з матеріалами на основі Ch, що відображаються у кількості тромбоцитів (c), середньому об'ємі тромбоцитів (Dv та ширині розподілу тромбоцитів (y)). \* зірочки позначають значення p між групами ChAG та ChEsM та контролем цільної крові ( $< 0,05$ ).

Через тиждень після резекції печінки ділянка, заповнена біоматеріалами, була оточена капсулою, що відокремлювала кровоспинні засоби від тканин

печінки. Біоматеріали виглядали як сітка з розгалужених і петельних оксифільних мембран, що утворюють губчасту пробку. Цікаво, що мембрани гемостатичних засобів мали різні особливості, що відрізнялися за товщиною та взаємодією з різними клітинами господаря. У групі застосування тахокомбу було небагато випадків з локусами некрозу всередині дефекту печінки, наповненого біоматеріалом, оточеним запальними клітинами (переважно нейтрофілами, макрофагами, лімфоцитами та еозинофілами). Група ChAG продемонструвала інтенсивну запальну інфільтрацію гемостатичного матеріалу та утворення капсули навколо нього. Тоді як у групі ChEsM були особливості вrostання у тканини хазяїна численних гігантських клітин чужорідного тіла, що оточують петлі ChEsM (рис. 2.16). Більшість випадків продемонстрували запальну інфільтрацію, яка була пов'язана з різним ступенем деградації гемостатичного агента.

У групі застосування тахокомбу фібрин або плазма з невеликою кількістю лейкоцитів (а) та гігантськими клітинами чужорідного тіла (б) знаходились у межах гемостатичного агента. Капсула навколо неї містила помірну кількість лейкоцитів (с), з невеликою кількістю колагенових волокон (d), щільною сітчастою волокнистою сіткою (e) і невеликою кількістю проліферуючих клітин (f). У групі ChAG ділянка сильно інфільтрувалась лейкоцитами PMN (g), які перетравлювали фрагменти біоматеріалів (h) та інфільтрованою капсулою навколо нього (i). Товста капсула, що відмежовує ChAG від тканин печінки, включала невелику кількість колагену та більше ретикулярних волокон (j-k) з невеликою кількістю проліферуючих клітин. ChEsM демонстрував помітне вrostання тканин хазяїна (m) та адгезію (n) епітеліоїдоподібних клітин до ChEsM. У капсулі була щільна мережа колагену (p) та ретикулярних волокон (q) з великою кількістю холангіол та проліферуючих клітин.

Розмір дефекту тканини та динаміка деградації гемостатичного матеріалу суттєво варіювали серед тварин різних груп (табл. 2.1). За один тиждень експерименту щури з ChAG мали найбільший розмір дефекту тканини - його діаметр був навіть більше, ніж початковий розмір пошкодження через



абсцесоподібну запальну інфільтрацію та утворення товстих капсул навколо. На противагу цьому, тахокомб та ChEsM продемонстрували значне скорочення області рани печінки ( $p < 0,001$ ) протягом 1-го тижня після гемостазу, що було пов'язано як з менш вираженою запальною реакцією, так і з особливостями деградації біоматеріалу.

Довгострокова оцінка показала найшвидший темп деградації біоматеріалів у групі застосування тахокомбу, де загальне зменшення розміру гемостатичного агента приблизно втричі з 1 по 8 тижень (рис. 2.16). Динаміка деградації ChEsM була порівнянна з тахокомбом протягом першого місяця експерименту. Однак протягом другого місяця дослідження темпи скорочення ChEsM уповільнились.

На відміну від них, ChAG демонстрував незначні зміни у розмірі губки. Повільна швидкість деградації була пов'язана з фіброзними змінами в капсулі та навколишніх тканинах, так що через два місяці експерименту діаметр дефекту печінки дорівнював початковому об'єму резекції.

На рисунку 2.17 d-f показано розмір, внутрішню структуру та товщину капсули навколо кровоспинних засобів через 8 тижнів після операції та гемостазу.

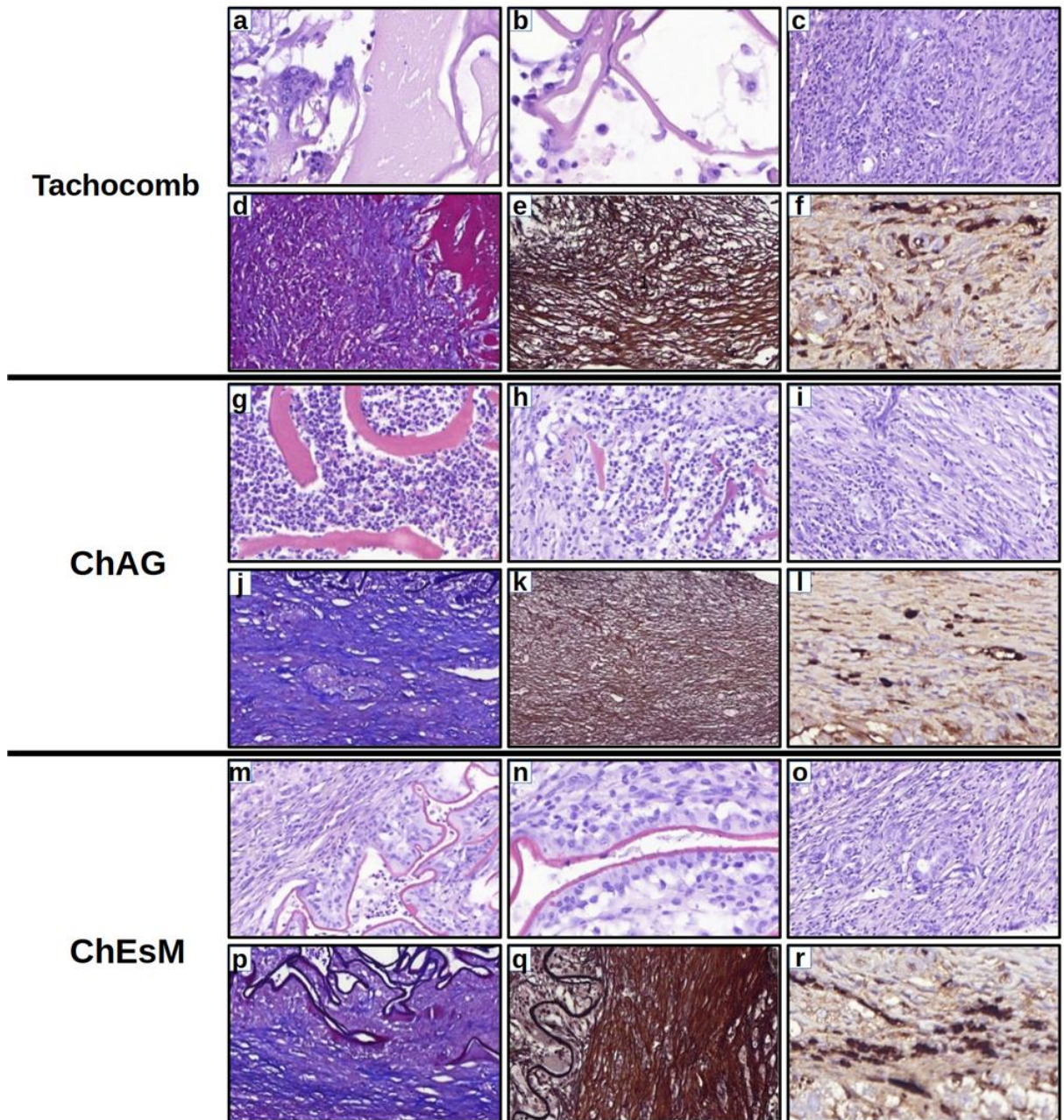


Рисунок 2.16 – Взаємодія між гемостатичним матеріалом та клітинами тварин різних груп через 7 днів дослідження *in vivo*. a-c, j-l, m-o - фарбування Н&Е,  $\times 200-400$ ; d, j, p - фарбування Массона; e, k, q - фарбування Гоморі,  $\times 200$ ; f, l, r - імуногістохімія для Ki-67, що візуалізує проліферуючі клітини,  $\times 400$ .

Таблиця 2.1 – Характеристика гемостатичного агента-клітини-господаря взаємодії в різних групах

Клітини/тканини	Часові моменти	Tachocomb	ChAG	ChEsM
<b>Характеристика біоматеріалу</b>				
<b>ВМ витончення і фрагментація ВМ</b>	1 тиждень	2	1	3
	4 тиждень	2	1	2
	8 тиждень	2	1	1
<b>Клітини хазяїна в біоматеріалі</b>				
<b>Пліморфноядерні лейкоцити</b>	1 тиждень	1	3	1
	4 тиждень	0	3	0
	8 тиждень	0	2	0
<b>Лімфоцити</b>	1 тиждень	1	1	1
	4 тиждень	0	0	0
	8 тиждень	0	0	0
<b>Вростання сполучної тканини</b>	1 тиждень	1	0	2
	4 тиждень	2	0	2
	8 тиждень	3	1	2
<b>Імунні клітини в капсулі навколо біоматеріалу</b>				
<b>Нейтрофіли</b>	1 тиждень	1	2	1
	4 тиждень	0	1	0
	8 тиждень	0	0	0
<b>M1-макрофаги</b>	1 тиждень	1	3	2
	4 тиждень	1	2	1
	8 тиждень	1	2	1
<b>M2-макрофаги</b>	1 тиждень	3	1	2
	4 тиждень	2	1	2
	8 тиждень	1	2	1

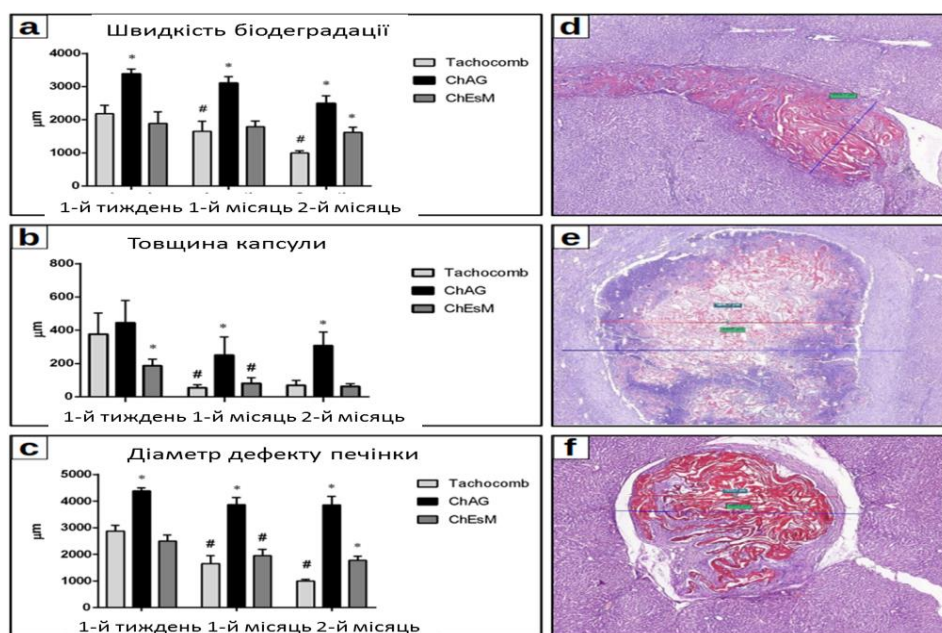


Рисунок 2.17 – Параметри біодеградації in vivo гемостатичних засобів протягом 2 місяців дослідження

### 2.3.8 Гістологічні та імуногістохімічні дослідження

Активний кровоспинний засіб Тахокомб викликав помірно гостре запалення протягом першого тижня. Численні поліморфно-ядерні лейкоцити проникли в залишки некротичних клітин печінки. Запальна інфільтрація супроводжувалась макрофагами типу M1, присутніми в капсулі. Однак їх кількість була меншою, ніж кількість макрофагів типу M2. Численні клітини CD163+ були виявлені на периферії капсули, навколо областей ангиогенезу та проліферації клітин печінки. Відновлення печінки було пов'язане з утворенням холангіол або щільних клітинних скупчень. На 4-му тижні було кілька запальних клітин, що відображали роздільну здатність імунної реакції. Капсула містила помірну кількість M1- та M2-макрофагів. Деградація біоматеріалу супроводжувалася різким зменшенням товщини капсули та ремоделюванням навколишніх тканин печінки. В результаті на 8-му тижні дефект печінки був мінімальним. Залишки гемостатичного матеріалу містили вrostання у тканинним господаря гігантських клітин чужорідного тіла, що беруть участь у резорбції біоматеріалів.

Група ChAG продемонструвала гостру запальну реакцію (1 тиждень), пов'язану з інфільтрацією поліморфно-ядерними клітинами як у центральних областях губки ChAG, так і в капсулі навколо. Капсула містила незначну кількість лімфоцитів та численні макрофаги, які були представлені здебільшого типом M1. Виражена запальна реакція була пов'язана з утворенням товстої капсули. Щодо відновлення печінки, деякі холангіоли були присутніми навколо зони дефекту печінки. Однак швидкість розповсюдження була нижчою, ніж при використанні Тахокомбу. Особливості гострої запальної реакції зберігаються на 4-му та 8-му тижнях, що відображає низьку біосумісність ChAG. На додаток до великої кількості макрофагів M1, що підтримують запальну інфільтрацію, на 4-му тижні було виявлено збільшення макрофагів типу M2. Це було пов'язано з відкладенням колагену в капсулі. Більш того, колагенові та ретикулярні волокна вирівнюються з поверхнею біоматеріалу, утворюючи товсті фіброзні смуги на периферії гемостатичної пробки.

У порівнянні з ChAG, високопористий біоматеріал ChEsM викликав значно нижчу імунну відповідь протягом першого тижня. Крім того, ChEsM продемонстрував високу адгезивність до клітин господаря, які робили листи на поверхні біоматеріалу. Низька ступінь запальної реакції була пов'язана з рівною кількістю макрофагів M1- та M2-типів на 1-му тижні дослідження. Гостра запальна реакція пройшла після 4-го тижня, що супроводжувалось інтенсивним вrostанням тканин хазяїна всередину гемостатичної губки, зменшенням товщини капсули та загальним зменшенням дефекту печінки. Хоча остаточна деградація ChEsM була нижчою, ніж у випадку використання Тахокомбу, електроспінінгові мембрани мали набагато вищу біосумісність порівняно з ChAG.

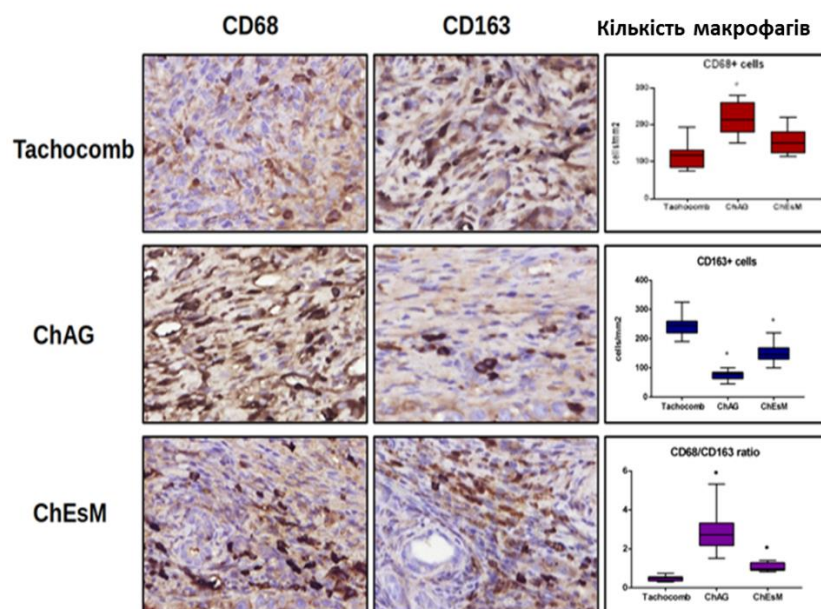


Рисунок 2.18 – Кількість та просторовий розподіл макрофагів M1 (CD68) та M2 (CD163) у капсулі навколо ВМ-пробки у різних групах через 7 днів після застосування різних гемостатичних засобів

M2-фенотип макрофагів переважав в капсулі тварин групи використання Тахокомбу (рис. 2.18). ChAG продемонстрував найбільшу кількість прозапальних типів макрофагів з низьким числом клітин CD163+. Група ChEsM показала однакову кількість CD68 та CD163 в капсулі. У більшості випадків

клітини CD163 розташовувались на зовнішньому шарі капсули, що відповідає ділянкам ремоделювання з особливістю відновлення тканин печінки та ангиогенезу.

## 2.4 Обговорення

Це дослідження продемонструвало відмінні функціональні характеристики, ефективність та безпеку препаратів на основі хітозану незалежно від способу їх синтезу. Ми підтвердили високі гемостатичні показники матеріалів на основі Ch, які були порівнянні з активним гемостатичним засобом біологічного походження. Ефективність зупинки кровотечі залежить від взаємодії біоматеріалу з клітинами крові та поглинання плазми. Взаємодія крові та активація гемостазу є критичними параметрами для гемостатичних матеріалів. Тестування *in vitro* показало, що як ChAG, так і ChEsM ефективно взаємодіють з тромбоцитами, індуючи їх активацію. Гемостатичний ефект хітозану включає аглютинацію білків крові та активацію тромбоцитів, що сприяє утворенню фібринового згустку. Як було показано раніше, чудовий гемостатичний потенціал препаратів на основі Ch пояснюється полікатіонною природою хітозану. Він легко взаємодіє з клітинами крові, оскільки плазмалема тромбоцитів та еритроцитів заряджена негативно. Матеріали на основі Ch стимулюють адгезію та агрегацію тромбоцитів, що важливо для початку гемостазу. Крім того, аміногрупи (такі як полі-N-ацетилглюкозамін), присутні в хітозані, сприяють агрегації еритроцитів [60]. Препарати на основі Ch показали міцну взаємодію з клітинами крові *in vitro* та короткий час кровотечі *in vivo*.

Більше того, як аерогель Ch, зшитий L-аспарагіновою та L-глутаміновою кислотами, так і електроспінінгові мембрани, виготовлені з Ch-PEO-кополімеру, мали високу пористість, яка важлива для всмоктування крові, але ChEsM продемонстрував значно вищий коефіцієнт площі поверхні. Попередні дослідження показали, що нановолокнисті матеріали проявляють високу

біоактивність і можуть посилювати гемостатичні параметри [61]. Однак ми не виявили відмінностей у часі кровотечі між ChAG та ChEsM.

Що стосується пошкодження тканин і кровотеч, є ще одна важлива властивість хітозану - він виявляє інгібуючу ефективність проти різних бактерій. Порівнюючи антимікробні властивості засобів на основі Ch, ми виявили, що Ch-аерогель продемонстрував значно вищу антибактеріальну активність щодо грамнегативних бактерій. Деякі автори вказують, що сприйнятливість бактерій залежить від грам-приналежності, і підтверджують, що більш високий інгібуючий ефект може бути виявлений до грамнегативних бактерій [62]. Антибактеріальна активність є дуже складним процесом, який варіюється між грампозитивними та грамнегативними бактеріями, базуючись на відмінностях у структурі клітин. Грамнегативні бактерії мають зовнішню мембрану, яка містить ліпополісахариди, що забезпечують гідрофільні властивості поверхні. Поверхні грампозитивних бактерій побудовані з пептидогліканів та тейхоевої кислоти і відіграють вирішальну роль у функціонуванні багатьох мембрано-пов'язаних ферментів [63]. Ліпополісахариди зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій, що містять фосфатні та карбонові групи, забезпечують поверхні високий полярний характер і щільність негативних зарядів. Висока поверхнева щільність заряду та гідрофільність бактерій підтримують взаємодію та адсорбцію хітозану до клітинної стінки та більш високе пригнічення росту для грамнегативних бактерій [64]. Приєднання та розмноження бактерій залежать від розміру волокна та хімічного складу поверхні. Діаметр волокна, близький до довжини бактерії, стимулює найвищі показники проліферації, тоді як нановолокна можуть викликати конформаційні зміни паличкоподібних бактерій, стримуючи процес колонізації бактерій [65]. Більш висока сприйнятливість бактерій до ChAG може бути обумовлена ефектом більшої площі поверхні цих зразків, що призводить до високих антибактеріальних показників [66].

Випробовуючи застосування препаратів на основі Ch для внутрішнього використання, важливо було перевірити їх безпеку та біосумісність. Агенти на основі Ch показали високу біосумісність у численних дослідженнях [36], [39],

[41]. Наші тести *in vitro* довели біосумісність як ChAG, так і ChEsM. Однак швидкість проліферації клітин була значно вищою для нановолокнистих матеріалів. Деякі дані демонструють переваги електроспінінгу для тканинної інженерії через можливу міграцію клітин у порах та зв'язок між клітиною та нановолокнами [67]. Відмінності в біосумісності ChAG та ChEsM були ще більш значними під час дослідження *in vivo*. ChEsM стимулював ріст тканин печінки, а ChAG асоціювався із запальною інфільтрацією. Така протилежна взаємодія між матеріалами на основі Ch та тканинами господаря може бути пов'язана як зі специфічністю Ch-біоматеріалів після обробки, так і з характером імунологічної відповіді на них.

Як вже згадувалося раніше, хітозан викликає адгезію та агрегацію тромбоцитів, активацію імунних клітин та відновлення тканин. Після активації тромбоцити оголюють різні рецептори на своїй мембрані та вивільняють численні розчинні медіатори, які регулюють запалення, ангиогенез та проліферацію клітин. Серед прозапальних молекул найважливішими є ліпідні медіатори (такі як простагландини, тромбоксан A<sub>2</sub>). Також активовані тромбоцити синтезують та секретують широкий спектр цитокінів, включаючи IL-1 $\beta$ , що полегшує експресію молекул адгезії та експресію хемокінів ендотеліальними клітинами [68]. Крім того, тромбоцити є джерелом численних хемокінів, таких як RANTES, PF-4, MCP-1, що залучають моноцити/макрофаги до місця пошкодження [67]. Крім того, тромбоцити містять різноманітні фактори росту, такі як судинний фактор росту ендотелію (VEGF), основний фактор росту фібробластів (bFGF), епідермальний фактор росту (EGF), ангиопоетин-1 (Ang1), фактор росту тромбоцитів (PDGF), фактор росту гепатоцитів (HGF) [69]. Ці фактори є важливими як для ангиогенезу, так і для відновлення тканин печінки.

Таким чином, стимулюючи активацію тромбоцитів, біоматеріали можуть сприяти як запальній реакції, так і відновленню. Усі біоматеріали можуть викликати запалення та реакцію на стороннє тіло, однак ступінь тяжкості та клінічний прояв цих реакцій широко відрізняються [70]. Проте, імуногенність та стимулюючі ефекти *in vivo* матеріалів на основі Ch були абсолютно різними, що



відображає чітку взаємодію ChAG та ChEsM з імунними клітинами та клітинами печінки. ChAG сприяв переважно реакціям вродженого імунітету з активною нейтрофільною інфільтрацією та активацією макрофагів M1. Важка запальна реакція все частіше визнається вирішальним компонентом впливаючи на регенерацію, і в нашому дослідженні ми показали, що асоційоване із ChAG запалення негативно корелювало з відновленням дефекту печінки.

Навпаки, застосування ChEsM асоціювалося з легким запаленням та переважною активацією макрофагів типу M2 та супроводжувало кращу деградацію біоматеріалу та сприяло відновленню печінки. Одним із можливих механізмів цих відмінностей є використання РЕО як компонента Ch-кополімеру в мембранах при використанні електроспінінгу. Крім того, висока пористість, наноструктурні та електростатичні ефекти можуть бути важливими для прямої взаємодії електроспінінгової мембрани з клітинами хазяїна. Роль структури біоматеріалів та їх фізико-хімічних властивостей у визначенні його взаємодії з клітинами та тканинами була показана в дослідженнях [71]. Модифікація поверхні РЕО-вмісних біоматеріалів може зменшити запальну адгезію клітин та запальну реакцію [72]. Імуномодулюючі властивості біоматеріалів можуть бути пов'язані з їх впливом на дендритні клітини господаря та макрофаги шляхом модуляції секреції цитокінів, що полегшує поляризацію M2-макрофагів [73].

Результати нашого дослідження продемонстрували, що фізико-хімічна модифікація біоматеріалу на основі Ch впливає на його біологічну сумісність, покращуючи імунну відповідь господаря та відновлення тканин.

## **Розділ 2 висвітлений у статтях:**

1. Radwan-Pragłowska, J. et al. Chitosan-based bioactive hemostatic agents with antibacterial properties - synthesis and characterization. *Molecules*. 2019, Volume 24, Issue 14, 2629.
2. Deineka, V. et al. Hemostatic performance and biocompatibility of chitosan-based agents in experimental parenchymal bleeding. *Materials Science and Engineering C*. 2020, 111740 (article in press).

### **3 АНТИМІКРОБНІ НАНОВОЛОКОННИСТІ МЕМБРАНИ ХІТОЗАНУ ВИГОТОВЛЕННІ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОПРЯДІННЯ, ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНІ НАНОЧАСТИНКАМИ СРІБЛА**

#### **3.1 Матеріали і методи**

##### **3.1.1 Виготовлення нановолокон Ch-AgNPs**

Ch (MW 50-190 кДа, DD 75-85%, Glenthams Life Sciences, Corsham, UK) розчиняли і змішували в TFA/DCM (Honeywell Fluka, Loughborough, Wiltshire, UK) у об'ємному співвідношенні 7:3. Кінцева концентрація розчину Ch становила 3,5%, мас/об.

Потім до розчину Ch додавали AgNPs (NanoWave, Гданськ, Польща) у концентрації, що розглядається відповідно до мінімальної інгібуючої концентрації (MIC) НЧ, вимірюваної для *S. aureus* та *E. coli* (2,5 та 1,25 мкг/мл відповідно) [105,106]. Зразки, розроблені для цього дослідження, були наступними: Ch без Ag, Ch-Ag 0,625 мкг/мл, Ch-Ag 1,25 мкг/мл і Ch-Ag 2,5 мкг/мл, що відповідає від ½ до 1 MIC AgNPs.

Застосовано джерело живлення постійного струму високої напруги (Linari Engineering s.r.l., Італія) на 21 кВ. Відстань між голкою і колектором 15 см. Електропрядіння проводили зі швидкістю подачі 1,0 мл/год. Зразки з електропрядіння нановолокна сушили у вакуумній печі при 30 °C протягом 24 год для видалення залишків розчинника. Усі мембрани нейтралізували розчином лугу (70% розчин етанолу) – 1М NaOH (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, США) протягом 24 год, промивали дистильованою водою та сушили протягом 24 год при кімнатній температурі [107]

##### **3.1.2 Морфологія нановолокон**

Морфологію характеристик нановолоконних зразків (вимірювання середнього діаметра нановолокна та розподілу діаметра нановолокна за мікрофотографіями SEM шляхом 50 вимірювань випадкових волокон) та колонізацію бактерій на електропрядних мембранах спостерігали за допомогою

скануючої електронної мікроскопії (FEI Inspect S50B SEM). , Брно, Чехія) після покриття зразків нановолокна вуглецем за допомогою вакуумної установки ВУП-5М (SELMІ, Суми, Україна).

### 3.1.3 Антимікробна активність мембран Ch-AgNPs

Для оцінки антибактеріальної дії мембран Ch-AgNPs були відібрані *E. coli* та *S. aureus*. Нічну культуру розбавляли до концентрації  $5 \log_{10}$  колонієутворюючих одиниць/мл (КУО/мл).

Бактеріостатичний вплив оцінювали диско-дифузійним методом Кірбі-Бауера. Спочатку на чашки з агаром Мюллера-Хінтона додавали кількість 100 мкл бактеріальної суспензії ( $10^5$  КУО·мл<sup>-1</sup>) і постійно струшували. Потім зразки додавали в чашки з агаром і культивували при 37 °С протягом 24 годин. Нарешті, були перевірені зони пригнічення росту.

Тести на антибактеріальну активність проводили методом бактеріальної суспензії. Спочатку мембрани розрізали на прямокутники 0,5 см<sup>2</sup> і стерилізували в ультрафіолетовій лампі протягом 24 год. Потім зразки поміщали в бактеріальну суспензію та інкубували протягом 2, 4, 6 та 8 год у стерильному 24-лунковому пластиковому планшеті. Необроблені бактерії, суспендовані в живильному бульйоні в концентрації  $10^5$  КУО/мл, використовували як контроль. Наприкінці кожного періоду 10 мкл бактеріальної суспензії переносили з кожної лунки та висівали на агарові чашки методом по Голду.

Антибактеріальну ефективність оцінювали шляхом розрахунку швидкості відновлення (R) загальної кількості бактерій за таким рівнянням (1) [108]:

$$R = (C-T) / C \times 100 \quad (1)$$

де: C (КУО/мл) і T (КУО/мл) – кількість бактерій, що вижили, у контрольних і досліджуваних зразках після певного часу контакту відповідно.

### **3.1.4 Зображення біоплівки SEM**

Для цього експерименту зразки інкубували протягом 24 год при 37 °C у бактеріальній суспензії. Після інкубації зразки біоплівки фіксували 2,5% глутаровим альдегідом 2 рази по 30 хв, зневоднювали в серії водних розчинів етанолу та сушили на повітрі при кімнатній температурі [109].

### **3.1.5 Статистичний аналіз**

Усі експерименти повторювали три або більше разів із потрібною кількістю зразків. Достовірні відмінності між групами оцінювали за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA).

## **3.2 Результати**

### **3.2.1 Морфологія нановолокон**

Середній діаметр функціоналізованих волокон AgNPs 2,5 мкг/мл становить  $318,5 \pm 84,9$  нм, що подібне до нативної хітози п волокон ( $p > 0,05$ ) (рисунок 2.1.). Концентрація полімеру, система розчинників, в'язкість розчину впливають на формування нановолокон та їх діаметр [110]. Додавання наночастинок срібла до розчину може впливати на провідність, що призводить до зменшення діаметра нановолокна [111]. Характеризуючи структурні властивості, немає доказів будь-яких відмінностей між порівнюваними зразками, незважаючи на додавання наночастинок срібла. Зображення SEM зразків з AgNP підтвердили, що наночастинки послідовно розподіляються на нановолокнах Ch.

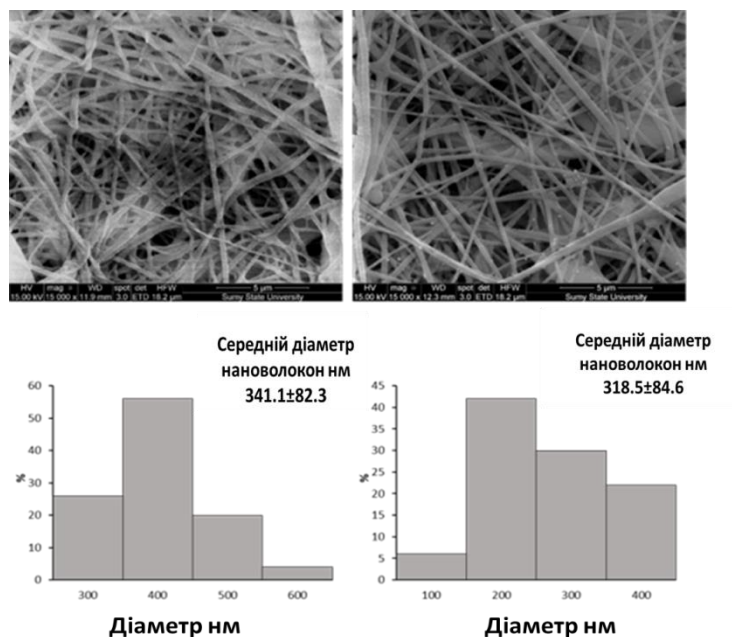


Рисунок 2.1 – Морфологія нановолокна хітозану (лівий ряд) і нановолокнистої мембрани після додавання 2,5 мкг/мл AgNP (правий ряд) і розподіл їх діаметрів,  $n=50$

### 3.2.2 Антимікробна активність

На Рис. 2.2 показана зона інгібування росту, отримана після інкубації різних типів мембран. Особливість антибактеріальної здатності мембран проти обох бактерій схожа. Діаметр зони інгібування росту навколо мембран збільшується зі збільшенням вмісту наночастинок срібла.

Проте інгібуючий потенціал зразків Ch-AgNPs щодо *E. coli* був вищим, ніж у *S. aureus*, як свідчить зона вищого інгібування (9 мм проти 7 мм відповідно) (Таблиця 2.1).

Таблиця 2.2 демонструє, що через 2 год зростання *S. aureus* зменшувався зі збільшенням навантаження AgNPs у зразках, тоді як для *E. coli* він був майже на тому ж рівні.

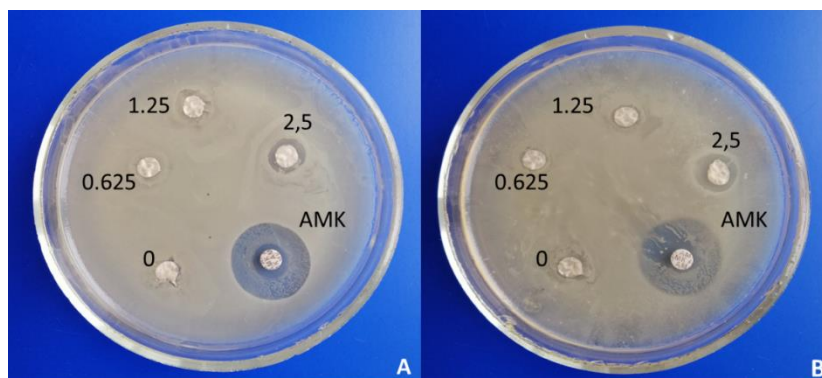


Рисунок 2.2 – Антибактеріальна активність електроспінінгових мембран, оцінена методом дискової дифузії Кірбі Бауера, порівняно з амікацином (АМК). Цифри вказують на вміст AgNPs в Ch мембранах. А – *S. aureus*, В – *E. coli*

Таблиця 2.1 – Діаметр зони інгібування росту, мм проти *S. aureus* та *E. coli*

Зразки	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
	Діаметр зони гальмування росту, мм	
Ch без Ag	6	6
Ch-Ag 0,625 мг/мл	6	7
Ch-Ag 1,25 мг/мл	8	7
Ch-Ag 2,5 мг/мл	7	9
АМК	15	15

Результати продемонстрували, що до 4 год популяції *S. aureus* поступово збільшувалися, і зразок Ch-Ag 0,625 мкг/мл не міг забезпечити зниження росту. Мембрани з більшою кількістю AgNP показали максимальне зниження росту обох бактеріальних штамів завдяки здатності наночастинок срібла порушувати цитоплазматичну мембрану бактерій і вивільняти внутрішньоклітинні білки [112]. В іншому випадку *E. coli* була більш чутливою до впливу зразка, оскільки позитивно заряджена вільна аміногрупа Ch може взаємодіяти з протилежною бактеріальною клітинною стінкою, що призводить до розриву мембрани [78].

Таблиця 2.2 – Швидкість зменшення (R) загальної кількості *S. aureus* та *E. coli* залежно від часу інкубації з мембранами Ch-TFA/DCM, кількісно оцінена методом КУО, %. Не було визначено різниці після 6 год та 8 год впливу порівняно з позитивним контролем для обох бактеріальних штамів (R=0)

Зразки	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Час інкубації, год			
	2 год	4 год	2 год	4 год
Ch безAg	25.0±6.25	12.5±6.25	25±6.25	0
Ch-Ag 0.625 мг/мл	25.0±6.25	16.3±3.75	28.8±3.75	0
Ch-Ag 1.25 мг/мл	28.8±3.75	25±3.75	37.5±6.25	12.5±6.25
Ch-Ag 2.5 мг/мл	28.8±3.75	28.8±3.75	41.3±3.75	16.3±3.75

### 3.2.3 Зображення біоплівки SEM

Продукцію біоплівки досліджуваних штамів бактерій (рис. 2.3.) оцінювали після 24-годинного спільного культивування. Обидва штами мали меншу кількість біоплівкової маси на зразках, інкорпорованих AgNP, ніж на ненавантажених мембранах [113, 114]. Крім того, наночастинки срібла, що входять до складу нановолокна хітозану, забезпечуючи стабільне вивільнення іонів срібла (Ag<sup>+</sup>), посилюють антибактеріальні властивості електропрядених матеріалів [79, 115]. AgNP можуть зв'язуватися з клітинною стінкою бактерій і викликати пошкодження мембрани, витікання клітин і загибель бактерій [116].

### 3.3 Обговорення

Мембрани Ch, інкорпоровані AgNP, продемонстрували вищу антибактеріальну активність, ніж ненавантажені зразки. Кількість включених наночастинок срібла, необхідна для запобігання прикріпленню та колонізації бактерій, не перевищувала ½ -1 MIC. Додавання наночастинок срібла зменшувало утворення біоплівки як *S. aureus*, так і *E. coli*.

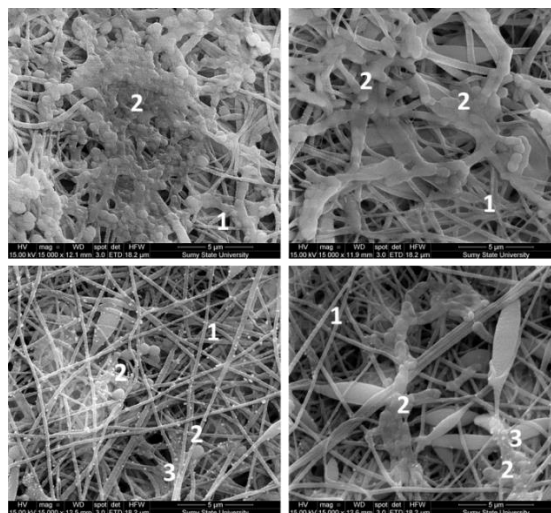


Рисунок 2.3 – SEM-зображення мембран після 24-годинної інкубації в бактеріальних суспензіях (верхній ряд – чиста Ch мембрана, нижній ряд – мембрана Ch-Ag 2,5 мкг/мл): 1 – волокна, 2 – бактеріальні клітини, 3 – AgNPs

### **Розділ 3 висвітлений у наступних роботах:**

1. Korniienko, V. et al. Antimicrobial electrospun chitosan nanofibrous membranes functionalized with silver nanoparticles. Proceedings of the 2021 IEEE 7th International Conference on Nanomaterials: Applications and Properties, NAP 2021 (article in press).
2. Матеріали розділу були частково використані при підготовці студентської наукової роботи студентки 6 курсу Навчально-наукового медичного інституту СумДУ Варави Ю. В. на Всеукраїнський конкурс студентських наукових робіт з галузей знань і спеціальностей (науковий керівник - відповідальний виконавець науково-дослідної роботи, с.н.с. ЦККНО ННМІ Корнієнко В.В.).



## **4 ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОВОЛОКНИСТИХ МЕМБРАН ВИГОТОВЛЕНИХ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОПРЯДІННЯ ІЗ ДОДАВАННЯМ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА**

### **4.1 Матеріали і методи**

#### **4.1.1 Приготування розчинів хітозану, електропрядіння нановолокнистих мембран хітозану та їх нейтралізація лугом**

Розчин хітозану (3,5%, вага/об'єм) готували шляхом розчинення порошку хітозану (Ch) (MW 50-190 кДа, DD 75-85%, в'язкість 20-300 сП Glentham Life Sciences, Corsham, UK) у співвідношенні суміші TFA/DCM (розчин Honeywell Fluka (Loughborough, Wiltshire, UK) рівний 9:1. AgNPs (NanoWave, Гданськ, Польща) готували за допомогою методу мокрого синтезу, описаного раніше [117]. Потім AgNPs додавали до Ch-TFA/ розчин DCM та перемішували на магнітній мішалці протягом ночі при кімнатній температурі. Концентрацію AgNPs розглядали відповідно до мінімальної інгібуючої концентрації (MIC) NPs, вимірної для *S. aureus* та *E. coli* (2,5 та 1,25 мкг/мл відповідно) [118,107]. Розчини Ch-TFA/DCM, розроблені для цього дослідження, містили таку кількість наночастинок: (a) 0,625 мкг/мл, (b) 1,25 мкг/мл, (c) 2,5 мкг/мл і (d) 5 мкг /мл, що відповідало від ½ до 2 MIC AgNPS.

Хітозанові нановолокнисті мембрани були виготовлені на колекторі електропрядіння, покритому алюмінієвою фольгою (Linari Engineering s.r.l., Італія). Металеву голку шприца об'ємом 10 мл (внутрішній діаметр 0,69 мм) заповнювали розчином. Відстань голка-колектор 15 см, швидкість подачі 1,0 мл/год, прикладена напруга 21 кВ. Умови електропрядіння були такими: вологість менше 35% і температура 21–24 °С. Хітозанові нановолокнисті мембрани сушили у вакуумній печі при 30 °С протягом 24 год для видалення залишків розчинників. [119].

Мембрани Ch-TFA/DCM нейтралізували в розчині луку (70% етанол/30% розчин води) – 1М NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США) протягом 24

годин, після чого багаторазово промивали дистильованою водою та висушували протягом доби при кімнатній температурі.

#### **4.1.2 Скануюча електронна мікроскопія (SEM) та енергодисперсійне рентгенівське випромінювання (EDX)**

За допомогою FEI Inspect S50B SEM (FEI, Брно, Чеська Республіка) спостерігали структуру волокна, прикріплення клітин та колонізацію бактеріями. Зразки напилювали під вакуумом карбоном на вакуумній установці ВУП-5М (СЕЛМІ, Суми, Україна). Діаметр волокна та пористість вимірювали за допомогою програмного забезпечення Image J. Частотні гістограми розподілу діаметра волокна були побудовані за допомогою програмного забезпечення Excel.

#### **4.1.3 Здатність до набухання (SD) і втрата ваги (WL)**

Мембрани розрізали на розміри 1,5 см × 1,5 см, а потім замочували у фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS) при нейтральному рН на 20 і 60 хв. Потім зразки видаляли пінцетом, надлишок води видаляли фільтрувальним папером і сушили при кімнатній температурі протягом 24 годин. Ступінь набухання (SD) розраховували за таким рівнянням (1) [120]:

$$SC (\%) = (W_d - W_s) / W_d \times 100 \quad (1)$$

де:  $W_s$  (г) – вага набряклого нановолокнистого килимка,

$W_d$  (г) – маса зразків після сушіння при кімнатній температурі.

Втрату маси (WL) зразків (1,5 x 1,5 см) визначали до і після занурення в PBS. Мембрани хітозану замочували в PBS (рН 7,4) на 1, 3, 7 і 28 днів. Потім зразки промивали водою Milli-Q і сушили протягом ночі при кімнатній температурі, щоб видалити поглинуту воду. Для розрахунку відсотка втрати ваги (WL) (2) було використано наступне рівняння [121]:

$$WL (\%) = W_s - W_d / W_d \times 100 \quad (2)$$

де:  $W_s$  (г) – вага набряклого нановолокнистого килимка,  
 $W_d$  (г) – маса зразків після сушіння при кімнатній температурі.

#### 4.1.4 Дослідження клітинної культури *in vitro*

Клітини (тип клітин U2OS) вирощували в модифікованому Dulbecco середовищі Eagle/живильної суміші F-12 (DMEM/F-12) з L-глутаміном, доповненим 100 од. мл-1 пеніциліну, 100 мкг, мл-1 стрептоміцину, 2,5 мкг. мл-1 амфотерицину В і 10% фетальної бичачої сироватки. Клітини культивували в пластикових культуральних колбах об'ємом 75 см<sup>2</sup> та інкубували в інкубаторі за стандартних умов культивування (37°C і 5% CO<sub>2</sub>). Клітини промивали фосфатним буферним розчином (PBS; рН = 7,4), після чого проводили інкубацію в трипсині/ЕДТА (0,25% трипсину, 1 мМ EDTA; Sigma), а потім повторно суспендували в середовищі. Зразки стерилізували контактом із 70% розчином етанолу протягом однієї години, потім тричі промивали стерильним PBS. Після цього клітини висівали на зразки при щільності висіву клітин 1×10<sup>4</sup> клітин/лунку, і до кожної лунки додавали 2 мл середовища. Поживне середовище змінювали кожні 2 дні. Життєздатність клітин оцінювали на 1, 3 і 7 день. В якості негативного контролю використовували лунки, які містили тільки клітини без зразків. Таким же чином інкубували зразки без клітин. У призначений час до кожної лунки додавали Alamar blue (Invitrogen, США) у кількості, що дорівнює 10% об'єму середовища, та інкубували протягом 8 год при 37 °C у темряві. Оптичну густина (OD) кожного зразка вимірювали при 570 і 595 нм за допомогою планшетного зчитувача (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Через 3 дні зразки збирали та фіксували 2,5% глутарового альдегіду (0,1 М PBS) протягом 40 хв, двічі. Потім фіксовані клітини зневоднювали шляхом занурення в зростаючу концентрацію етанолу у воді (50–

96%) на 30 хв при кожній концентрації. SEM використовували для визначення морфології клітин на поверхні зразків.

#### **4.1.5 Бактеріологічний експеримент**

Для оцінки антибактеріальної активності Ch-TFA/DCM мембран було відібрано *E. coli* та *S. aureus*, отримані з Національної колекції мікроорганізмів (Інститут мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного, Україна). Штами культивували в бульйоні при 37°C протягом 24 год. Зразки площею 0,5 см<sup>2</sup> готували в асептичних умовах і поміщали в стерильний 24-лунковий пластиковий планшет з 2 мл попередньо приготовленої бактеріальної суспензії (10<sup>5</sup> КУО/мл). Бактерії, суспендовані в живильному бульйоні, використовували як контроль. Після інкубації протягом 2, 4, 6 і 8 годин поживний агар інокулювали аліквотами по 10 мкл з кожної лунки, а потім інкубували при 37 °C протягом 12 годин для подальшого підрахунку колоній.

#### **4.1.6 Статистичний аналіз**

Односторонній дисперсійний аналіз (ANOVA) проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica® v.8. Результати були виражені як середнє ± стандартне відхилення. Значення *p* менше 0,05 вважалося значущим. Всі досліді проводилися в трьох повторях.

### **4.2 Результати**

#### **4.2.1 SEM і EDX**

Системи співрозчинників TFA та DCM 9:1 використовували для приготування мембрани методом електропрядіння. TFA утворює солі з аміногрупами хітозану, які руйнують молекули взаємодію мономерами хітозану, роблячи їх придатними до електроспінінгу [122]. Сканувальна електронна мікроскопія демонструє утворення високопористої мембрани з випадково орієнтованими волокнами діаметром 200 ± 10 нм. Структурних дефектів і склеювання волокон не було (рис. 3.1.). Нановолокниста мембрани з хітозану має

високу швидкість деградації та потребує нейтралізації. Через 24 години після обробки в розчині лугу (70% етанолу/30% розчину води) діаметр волокна збільшується до  $300 \pm 10$  нм і зменшується пористість з 7,9% до 4,5%. Набухання і склеювання волокна є основною причиною структурних змін.

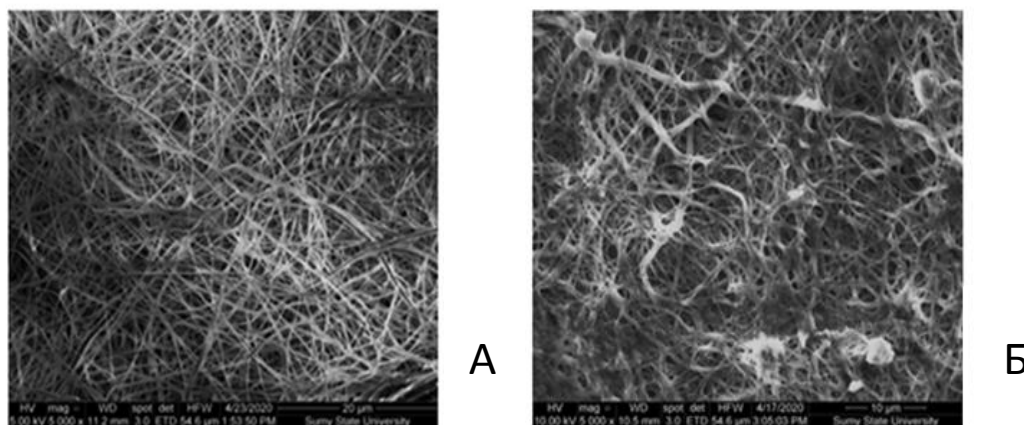


Рисунок 3.1 – Мембрани Ch-TFA/DCM до (А) і після обробки 1М NaOH 70% етанол/30% водним розчином (Б)

Додавання AgNPs до розчину не вплинуло на кінцеву морфологію електропрядених мембран (рис. 3.2, верхній ряд), які демонструють випадкову архітектуру. Ag AgNPs істотно впливають на діаметр волокон і пористість, які зменшуються до  $160 \pm 1,3$  нм і 2,41%. Хан та ін. показали, що введення срібла в розчин електропрядіння підвищує його провідність і зменшує діаметр волокна після процесу прядіння [123].

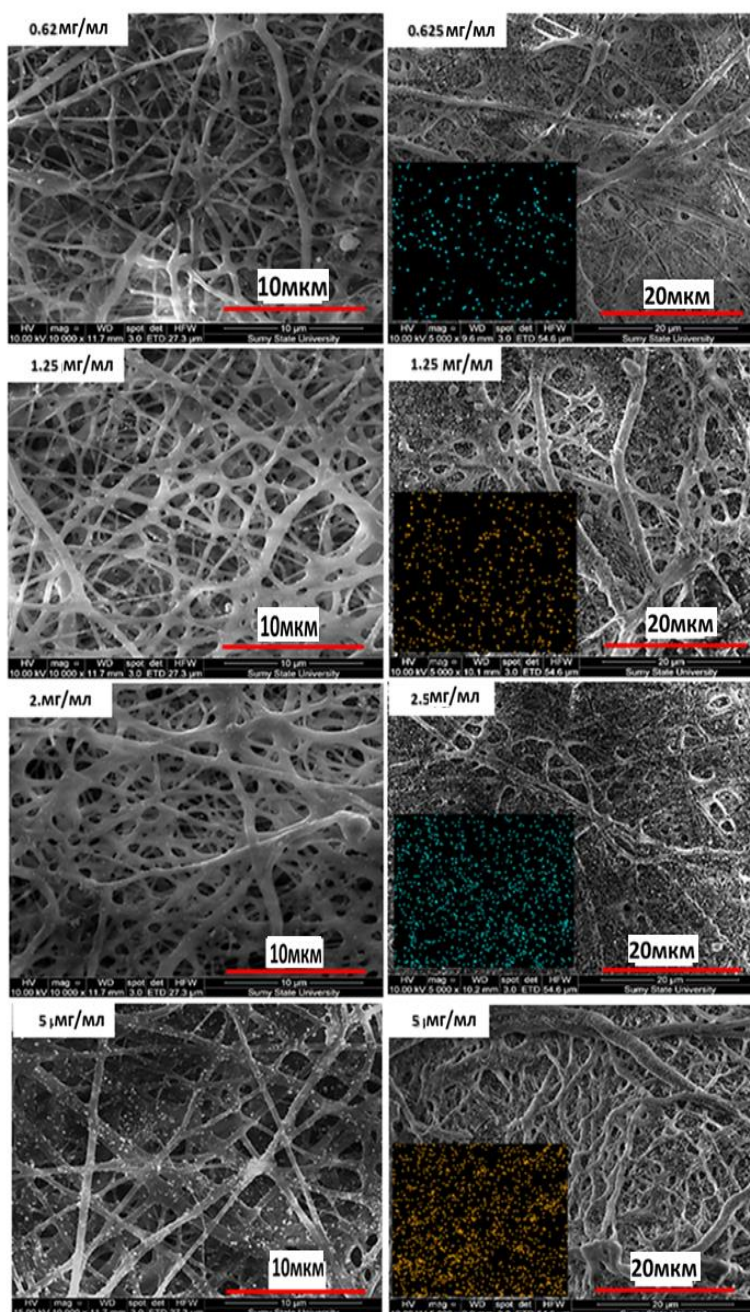


Рисунок 3.2 – Мембрани Ch-TFA/DCM з AgNP в різних концентраціях до (лівий ряд) і після обробки в 70% розчині етанолу / 30% водному розчині (правий ряд) з EDX розподілом AgNP (вставка)

Протягом ночі обробка 70% етанол/30% водним розчином призводить до збільшення діаметра волокна та зменшення пористості так само, як у мембранах без AgNPs (рис. 5). EDX демонструє рівномірний розподіл AgNPs всередині мембран (рис. 3.2., нижній ряд, вставка). Концентрація AgNPs не вплинула на структуру мембрани (як до, так і після обробки).

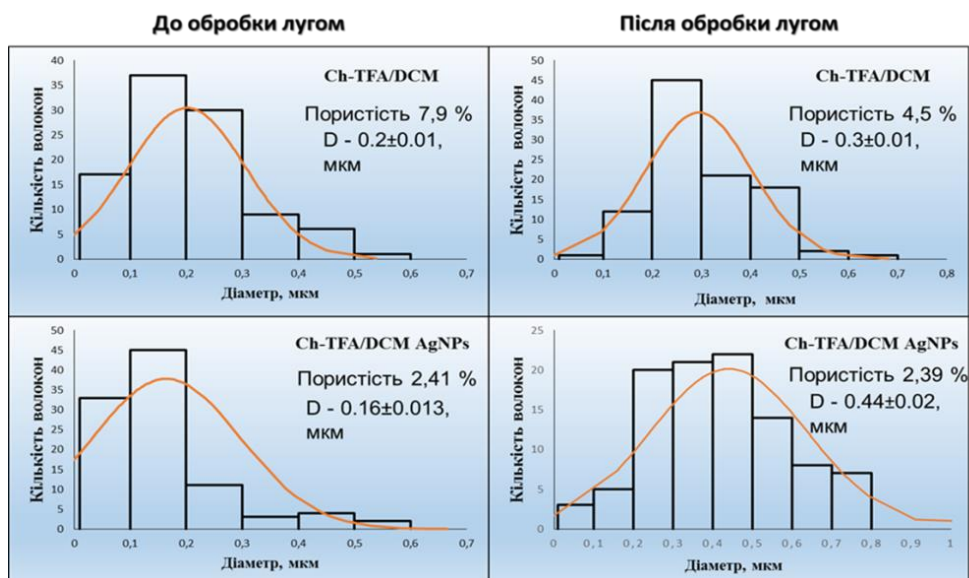


Рисунок 3.3 – Розподіл діаметру волокон та пористості хітозанових мембран до та після обробки лугом

#### 4.2.2 Здатність до набухання (SD) і втрата ваги (WL)

Кінетика деградації волокнистих мембран після нейтралізації в суміші етанол-вода та після видалення надлишку розчинної солі TFA/DCM показала, що нейтралізація лугом 1M NaOH є доцільною для збереження структури нановолокна (рис.3.4.). Здебільшого отримані нановолокна зберігали морфологію після багаторазового занурення в PBS. Здатність набухання фіброзних мембран була майже на однаковому рівні через 20 хв і 60 хв занурення. Втрата ваги нановолокнистих зразків під час занурення в PBS постійно збільшувалася протягом перших трьох днів і помітно збільшувалася після 1-го тижня. Суттєва різниця у втраті ваги спостерігалася лише між 3-м і 28-м днем аналізу ( $p \leq 0,01$ ). Відсутність деградації хітозанових волокон після тижня аналізу може бути пояснена відсутністю ацетильних груп [124]. Розбіжностей у точках деградації серед зразків з різним вмістом AgNPs не було.

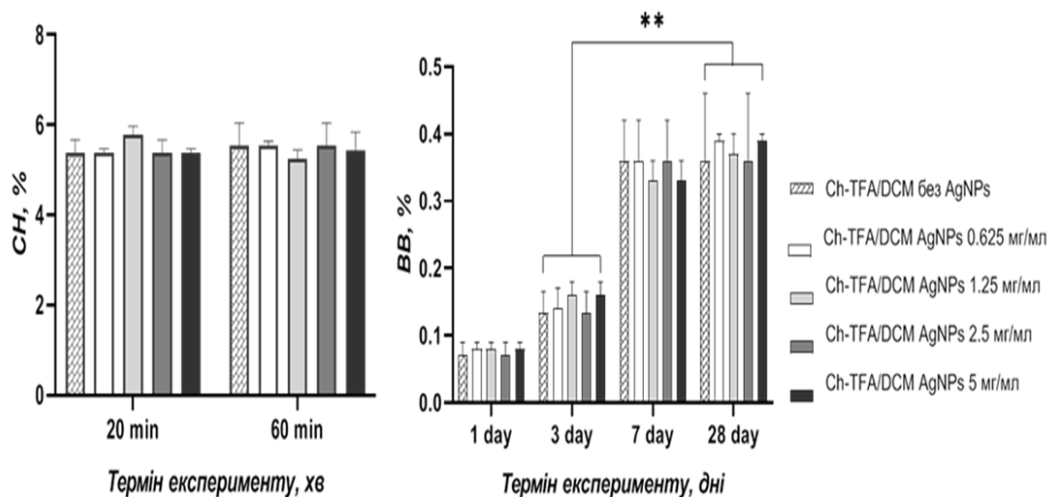
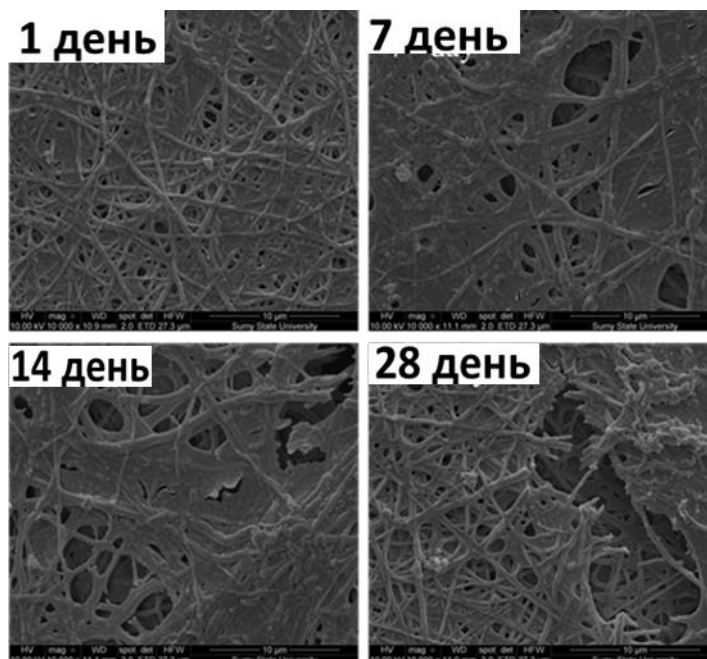


Рисунок 3.4 – Кінетика деградації (SD та WL) волокнистих мембран Ch-TFA/DCM, з наночастинками срібла. Зірочки вказують на статистично значущі відмінності між двома групами

Нановолокнисті мембрани зберегли структуру хітозанового нановолокна через після одностороннього занурення в PBS. Після трьох днів занурення в PBS спостерігалася зменшення загальної пористості мембрани. Слід зазначити, що більшість волокон зберегли свою структуру. На цьому дібу спостерігалися численні набряклі нановолокна зі збільшенням кількості острівців зрощених волокнистих пучків [125]. Крім того, в структурі зразків з'явилося стоншення волокон і тріщини (рис. 3.5.). Кількість розривів і витончення волокон збільшилася до 28 доби експерименту. Вага змінилася в результаті розчинення волокон. Наприкінці дослідження незначну зміну ваги можна пояснити відкладенням фосфату, видимим на поверхні після 28 днів занурення.

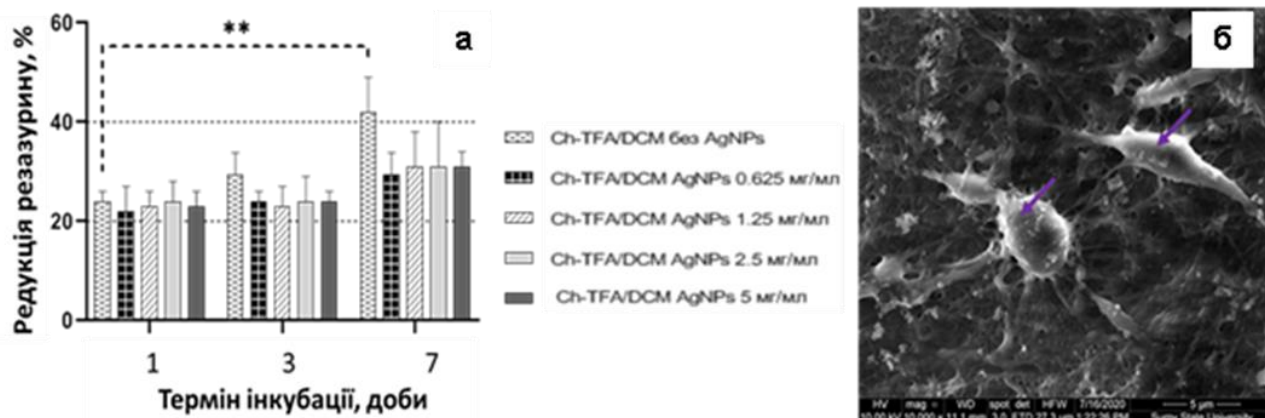




Рисунк 3.5 – SEM Ch-TFA/DCM мембран, завантажених наночастицями срібла, під час 4-тижневого занурення в PBS

#### 4.2.3 Дослідження клітинної культури *in vitro*

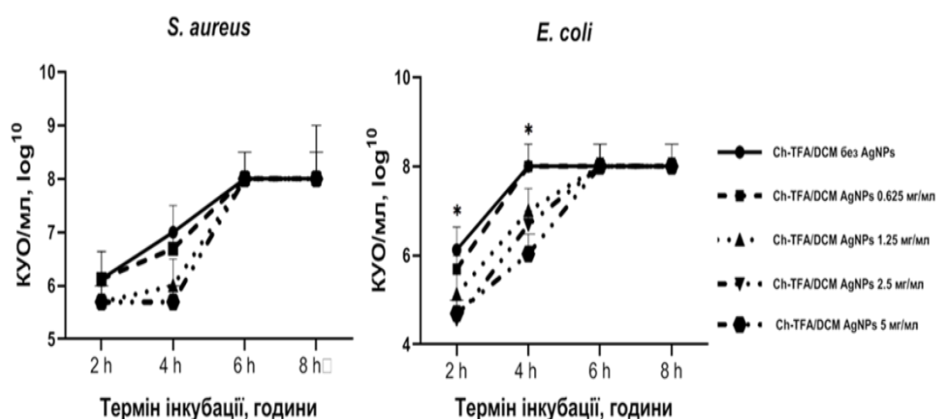
Значення оптичної щільності (OD), що представляють кількість клітин, присутніх на мембранах, підтверджують подібний ріст клітин у кожній точці часу культивування (рис. 3.6.), незважаючи на кількість срібла. Проте через 3 та 7 днів значення OD для зразків без срібла було вищим, ніж для зразків із сріблом. Клітини, культивовані на ненавантажених AgNPs хітозанових мембранах на 7 день, продемонстрували приблизно в 2 рази вищу життєздатність, ніж на 1 день. Проте життєздатність клітин на срібловмісних зразках була вищою в динаміці культивування. Ці дані свідчать про те, що проліферація клітин після приєднання клітин відбувалася під впливом AgNP, але застосовувані концентрації срібла не пригнічували проліферативну активність остеобластів.



Риснок 3.6 – Дослідження відновлення резазурину з клітинами U2OS, засіяними на хітозанові мембрани з різною кількістю AgNPs (а),  $**p < 0,01$ ; SEM клітин U2OS на поверхні хітозанової мембрани містила максимальну кількість AgNPs через 7 днів після посіву клітин (б), фіолетовими стрілками вказано клітини

#### 4.2.4 Антибактеріальна ефективність волокнистих мембран Ch-TFA/DCM з наночастинками срібла

На Рис. 3.7. показана антибактеріальна активність мембран проти досліджуваних бактерій *in vitro*, кількісно оцінена методом КУО.

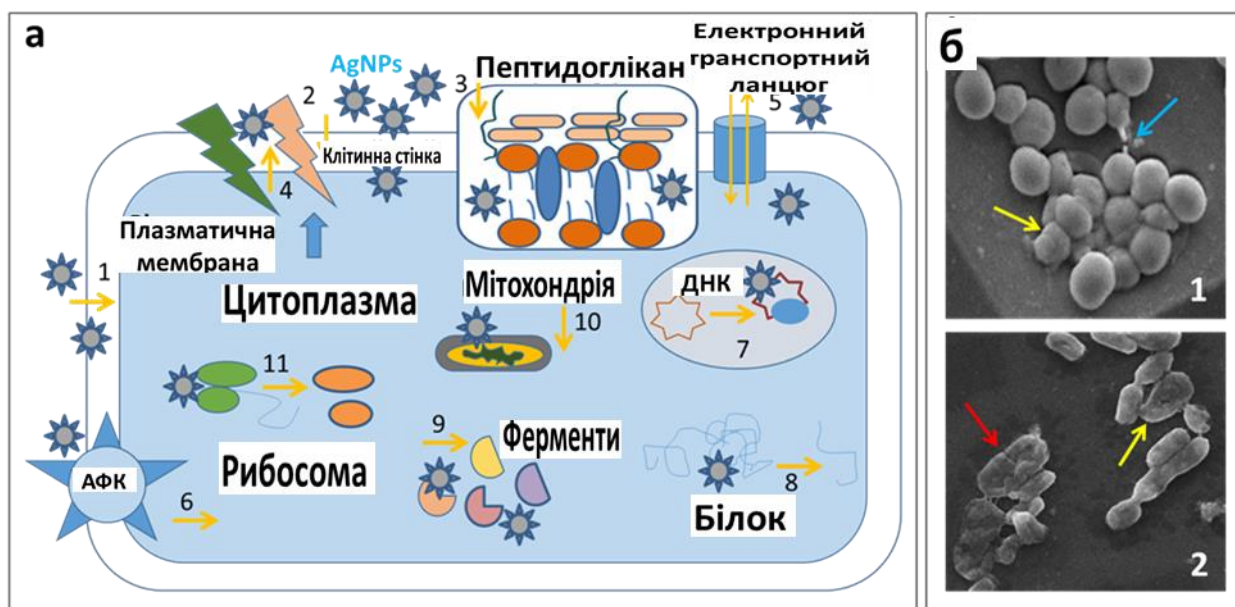


Рисунк 3.7 – Антибактеріальна ефективність мембран Ch-TFA/DCM з різною кількістю AgNP, проти *S. aureus* і *E. coli*, КУО/мл

Значне залежне від дози AgNPs зменшення популяції бактерій *S. aureus* та *E. coli* (5,5 log та 6 log відповідно) спостерігалось на 4-добі експерименту. Крім

того, була помітна залежна від часу динаміка швидкості зменшення загальної кількості обох штамів бактерій, інкубованих з мембранами Ch-TFA/DCM. В іншому випадку всі типи мембран мали більш високу антимікробну активність щодо грамнегативних бактерій, ніж до грампозитивних після 2 год експерименту. Доведено, що хітозан має більш значний вплив на грамнегативні бактерії завдяки їх вищій гідрофільності, ніж у грампозитивних бактерій [78]. В даний час хітозан, як агент, що впливає на зовнішню мембрану, володіє скоріше бактеріостатичними властивостями, ніж бактерицидними. Однак для підвищення антимікробного потенціалу біофункціональних матеріалів хітозан можна комбінувати з іншими антимікробними агентами [124]. Таким чином, через 4 години спільного культивування з мембранами, які містили AgNP, швидкість редукції *S. aureus* була порівняно вищою, ніж *E. coli*. Це підтверджує результати інших дослідників про те, що навантаження сріблом мембран надавало їм посилюючий антибактеріальний ефект на грампозитивні та грамнегативні бактерії [125].

Загальний механізм антибактеріальної дії хітозану та наночастинок срібла був посилений можливими механізмами AgNPs [126], представленими на малюнку 3.8.(а). В результаті впливу мембран Ch, завантажених AgNPs, на SEM було виявлено порушення цілісності бактеріальної мембрани, що призводить до витоку внутрішньоклітинних сполук (рис. 3.8 (б)).



Рисуно 3.8 – Загальні механізми антибактеріальної дії AgNPs (а):

1) змінюють проникність мембрани – пошкодження та лізис мембрани; 2) порушення клітинної стінки - перфорація - утворення пор; 3) руйнування пептидоглікану; 4) цитоплазматичний витік; 5) обрив ланцюга транспорту електронів; 6) окислювальний стрес - зниження утворення АТФ; 7) деградація ДНК - перешкода реплікації; 8) денатурація білка; 9) інактивація ферментів; 10) дисфункція мітохондрій; 11) руйнування рибосом - пригнічення синтезу білка; і SEM зображення (б) ураження бактеріальної мембрани (1 - *S. aureus* і 2 - *E. coli*) після 8 годин спільного культивування з мембранами Ch-TFA/DCM, навантаженими AgNPs: стрілки вказують на руйнування бактеріальних клітин (жовті – ушкодження мембрани шляхом перфорації, сині – витікання цитозолу, червоні –лізис клітин).

#### Розділ 4 висвітлений у наступних роботах:

1. V. Korniienko et al. Functional and biological characterization of chitosan electrospun nanofibrous membrane nucleated with silver nanoparticles. *Appl. Nanosci.*, 2021.
2. Матеріали розділу були частково використані при підготовці студентської наукової роботи студентки 6 курсу Навчально-наукового медичного інституту СумДУ Варави Ю. В. на Всеукраїнський конкурс студентських наукових робіт з галузей знань і спеціальностей (науковий керівник - відповідальний виконавець науково-дослідної роботи, с.н.с. ЦККНО ННМІ Корнієнко В.В.).

## 5 ПОЛІКАПРОН-МХЕНЕ НАНОВОЛОКНИСТІ МЕМБРАНИ ДЛЯ ТКАНИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

### 5.1 Матеріали та методи

#### 5.1.1 Виготовлення нановолокнистих мембран з PCL

Для отримання електропряденої нановолокнистої матриці використовували полікапролактон з молекулярною масою 4500 г/моль (Sigma Aldrich, США), хлороформ (99% чистоти), етанол (95,4–96,8%) і оцтову кислоту (99%) придбані у Penta Chemicals (Прага, Чехія). Полімерний розчин (16 мас.% PCL) був розчинений у суміші хлороформ/етанол/оцтова кислота у співвідношенні 8:1:1 і перемішаний при кімнатній температурі протягом 4 годин для розчинення полімеру [203]. Параметри електроспінінгу були використані, як описано в [164] з модифікаціями (25 кВ напруга, відстань 180 мм і швидкість подачі 12 мл/год).

#### 5.1.2 Синтез і характеристика MXene

$Ti_3C_2T_x$  MXene був отриманий за допомогою методу мінімально інтенсивного розшарування (MILD) [204] з використанням прекурсора MAX-фази  $Ti_3AlC_2$  виробництва Центру матеріалознавства (МРЦ, Київ, Україна). Алюмінієві шари в  $Ti_3AlC_2$  були вибірково видалені фтористоводневою кислотою (HF), утвореною на місці в суміші фториду літію (LiF) і соляної кислоти (HCl) у воді. Гравований багатошаровий MXene порошок розшарували за допомогою інкубації з 50 г/л LiCl у дистильованій воді при 35°C протягом ночі з струшуванням та подальшим повторним центрифугуванням при 1160 g (3500 об/хв) протягом 10 хв у воді для вимивання солей. Після 2-3 циклів центрифугування, коли іонна сила розчину зменшилась, MXene розділяються на одношарову та багатошарову форму і переходять у колоїдний розчин, про що свідчить потемніння супернатанту після центрифугування. Цей темно-зелений супернатант збирали і центрифугували при 3420 g (6000 об/хв) протягом 60 хвилин для осадження одношарового MXene у формі вологої суспензії.

Встановлено, що масовий вміст сухих MXene у вологому осаді становить приблизно ~20%. Розчин MXene був нанесений краплиною на підкладку та візуалізований за допомогою електронного мікроскопа Zeiss Supra 50VP. Скануюча електронна мікроскопія (SEM) зображення показали, що типовий розмір пластівців MXene становив 1-3 мкм. Готовий зразок MXene був досліджений методом рентгенівської дифракції (XRD) та було доведено, що він є однофазним. XRD картини після відшарування показали лише типові (001) піки MXene, що підтверджує повне видалення MAX фази.

### **5.1.3 Імобілізація MXene на нановолоконних мембранах PCL**

Перед імобілізацією MXene, оригінальні мембрани PCL, нарізані дисками Ø 5 мм, обробляли в 1М NaOH протягом 4 годин при 30°C, щоб покращити гідрофільність поверхні PCL і промивали у деіонізованій воді протягом 24 годин. Колоїд MXene був отриманий диспергуванням 0,02 г вологої суспензії MXene в 4 мл деіонізованої води. Пізніше PCL мембрани були занурені у скляну ємність, наповнену 1 мл готового розчину MXene (для запобігання окисленню MXene ємність продувають аргоном). Колоїд MXene з мембранами PCL обробляли ультразвуком протягом 5 хв ультразвукової ванні (50 В при 40 кГц) і залишили на 3 години для імобілізації MXene на мембранах PCL. Мембрани промивали та сушили на фільтрувальному папері протягом 24 год. Цю процедуру повторювали до 4 разів для отримання мембран PCL з різною товщиною шарів MXene. Зразки маркувалися як PCL-MX-1, PCL-MX-2, PCL-MX-3 та PCL-MX-4 із зазначенням кількості циклів покриття.

### **5.1.4 Вимірювання контактного кута**

Контактні кути на оригінальних і покритих MXene PCL мембранах вимірювали з 2 мкл краплі деіонізованої води за допомогою приладу для вимірювання контактного кута OCA 15 EC, серія GM-10-473 V-5.0 (Data Physics, Фільдерштадт, Німеччина). Крім статичного контактного кута вимірювали динаміку поглинання краплі та швидкість зміни контактного кута після

осадження води. Динаміка вимірювання контактного кута дозволила спостерігати різницю у змочуваності між зразками шляхом запису кривої адсорбції [206].

### **5.1.5 Інфрачервона та рентгенівська фотоелектронна спектроскопія**

Інфрачервону спектроскопію проводили за допомогою Perkin-Elmer Spectrum Two (Waltham, MA, USA) спектрометра, оснащеного універсальним модулем ATR (Single Reflection Diamond). XPS аналіз було проведено за допомогою напівсферичного аналізатора енергії електронів PREVAC EA15, 2D багатоканального пластинчастого детектора джерела рентгенівського випромінювання Al-K $\alpha$  (подвійний анод PREVAC XR-40B) з енергією 1486,6 еВ. Основний тиск системи дорівнював  $1,2 \times 10^{-7}$  Па. Для отримання оглядових спектрів були встановлені наступні параметри: пас. енергія: 200 еВ, крок сканування: 0,9 еВ; тоді як для спектрів високої роздільної здатності 100 еВ і 0,05 еВ відповідно. Компонент C–C спектрів C1s (284,8 еВ) використовувався для калібрування енергії зв'язку. Отримані спектри були підігнані за допомогою програмного забезпечення CASA XPS® і вбудованих алгоритмів. Компоненти спектрів високої роздільної здатності були представлені лініями Гауса (70%) і Лоренца (30%), а фон – з функцією Shirley.

### **5.1.6 Скануюча електронна мікроскопія з енергодисперсійною рентгенівською спектроскопією**

Скануючий електронний мікроскоп SEO-SEM Inspect S50-B (FEI, Брно, Чехія) з прискорювачем напругою 15 кВ, оснащений енергодисперсійним рентгенівським спектрометром (AZtec One з X-MaxN20, Oxford Instruments plc, Абінгдон, Великобританія) використовувався для структурної оцінки пряденого та іммобілізованого MXene PCL мембрани.

### **5.1.7 Просвічуюча електронна мікроскопія та спектроскопія втрат енергії електронів**

Характеризацію TEM та EELS проводили за допомогою просвічуючий електронний мікроскоп JEOL JEM-ARM200CF на 200 кВ аналітичного сканування з подвійною корекцією. ПЕМ-зображення були записані за допомогою нижньої камери CCD Gatan Ultrascan 1000 XP з роздільною здатністю  $2048 \times 2048$  пікселів за допомогою Digital Micrograph 3.43 SW package (Gatan, США). Спектри EELS збирали в режимі STEM за допомогою а Фільтр зображення GIF Quantum ER 965.2KP/спектрометр EELS з дисперсією 0,25 еВ/канал і входом діафрагма 5 мм. Півкут збору становив 58,5 мрад, а напівкут конвергенції зонда становив 22,3 мрад.

### **5.1.8 Електропровідність**

Вимірювання змінного струму проводились на стенді, розробленому та виготовленому на кафедрі електричних пристроїв та технології високої напруги, Люблінський технічний університет, як було описано раніше [207]. На стенді був гелієвий кріостат CS 204AE-FMX-1AL (Advanced Research Systems, Inc., США), який дозволяє проводити вимірювання в діапазоні температур від 20 К до 450 К з точністю 0,002 К. Вимірювання проводили у вакуумі ( $\sim 2 \times 10^4$  Па). Параметри ємності та індуктивності були виміряні через кожні 2 К в діапазоні 20–40 К; кожні 3 К в діапазоні 40–151 К; і кожні 7 тис. в діапазоні 151–305 К. Для змінного струму використовувався вимірювач імпедансу 3532 LCR HiTESTER (HIOKI, Японія). Амплітуда напруги  $U$ , прикладеної до досліджуваного зразка, становила 0,4 В. Імпеданс лічильник і терморегулятор були підключені до комп'ютера, на якому отримані результати вимірювання були записані. Тонкі шари ( $\sim 10$  мкм) срібної пасти наносили на обидва кінці тестованих мембран, щоб усунути перехідний опір в місці контакту зразка з контактами. Перемінний струм подавався між двома контактами на кінцях мембран. Це означає, що як справжні складові струму, так і уявна складова, яка складається з ємнісного та індуктивного струмів, потік між однаковими контактами. Тому була обрана



паралельна еквівалентна схема вимірювачів опору для вимірювання параметрів змінного струму мембран. Вимірювання проводилися в діапазоні температур 20–305 К і частотами від 50 Гц до 1 МГц з кроком 50 точок на декаду. Є два компоненти струму в паралельних колах змінного струму, що складаються з елементів RLC[208]. Перший з них, реальний компонент, знаходиться в фазі з прикладеною синусоїдальною примусовою напругою. Його значення визначається формулою:

$$I_R = \frac{U}{R_p}, \quad (1)$$

де  $I_R$  — реальна складова струму,

$R_p$  — опір паралельного ланцюга,

$U$  — синусоїдальна примусова напруга. Друга складова струму, яка називається уявною складовою, визначається значенням сприйнятливості  $B$ :

$$I_I = U \cdot B = U \cdot \left( \omega \cdot C_p - \frac{1}{\omega \cdot L_p} \right), \quad (2)$$

де  $B$  – сприйнятливість;

$\omega = 2\pi f$  – кутова частота,

$C_p$  – ємність у паралельному колі,

$L_p$  – індуктивність в паралельному колі. Одним із основних параметрів змінного струму паралельного кола RLC є кут зсуву фаз між вектором дійсної складової струму та результуючого вектора струму. Значення фазового зсуву кут визначається формулою:

$$\varphi = -\arctg \left( R_p \cdot \left( \omega \cdot C_p - \frac{1}{\omega \cdot L_p} \right) \right), \quad (3)$$

де  $\varphi$  – кут фазового зсуву,

$\omega=2\pi f$  – кутова частота,

$f$  – частота,

$R_P$  – опір,

$C_P$  – ємність,

$L_P$  — індуктивність паралельного кола.

$$\omega_r = \frac{1}{\sqrt{L_P \cdot C_P}} \quad (4)$$

У паралельних колах RLC з резонансною кутовою частотою  $\omega_r=2\pi f_r$  виникають резонансні струми [209]. З рівняння для сприйнятливості (2) випливає, що на резонансній кутовій частоті  $\omega_r$  модулі ємнісної та індуктивної складової частоти рівні, а їх різниця дорівнює нулю. Значення резонансної кутової частоти паралельного контуру визначається за формулою:

$$Y = \frac{I}{U}, \quad (5)$$

де  $Y$  – провідність ланцюга.

$$|B| = \| Y | \sin \varphi |, \quad (6)$$

де  $B$  — сприйнятливість.

$$C_{PM} = \frac{|B|}{\omega}, \quad (7)$$

де  $C_{PM}$  – ємність, виміряна вимірювачем імпедансу,

$\omega = 2\pi f$  – кутова частота.

$$L_{PM} = \frac{1}{\omega \cdot |B|}, \quad (8)$$

де  $L_{PM}$  — значення індуктивності, виміряне вимірювачем імпедансу.

Підставляючи значення резонансної кутової частоти (4) у рівняння для вимірюваної величини ємності (7) отримуємо:

$$C_{PM}(\omega_r) = \frac{|B|}{\omega_r} = \frac{1}{\omega_r} \left| \omega_r \cdot C_P - \frac{1}{\omega_r \cdot L_P} \right| = \left| C_P - \frac{1}{\omega_r^2 \cdot L_P} \right| = \left| C_P - \frac{C_P \cdot Z_P}{Z_P} \right| = 0 \quad (9)$$

де  $C_{PM}(\omega_r)$  - це значення ємності на резонансній кутовій частоті, виміряне приладом для вимірювання опору HiTESTER у паралельній еквівалентній схемі,

$C_P$  – дійсне значення ємності в досліджуваній паралельній схемі,

$L_P$  – реальне значення індуктивності в досліджуваному паралельному контурі,

$\omega_r = 2\pi f_r$  – резонансна кутова частота,

$f_r$  – резонансна частота.

Рівняння (9) показує, що чіткий мінімум вимірної ємності з'явиться на резонансі кутової частоти, що дозволяє спостерігати резонанс струмів і визначати величину на резонансній кутовій частоті  $\omega_r$ . Підставляючи виміряне значення сприйнятливості, задане рівнянням (2), і значення резонансної кутової частоти (4) у формулу (8) отримуємо рівняння:

$$L_{PM}(\omega_r) = \frac{1}{\omega_r \cdot |B|} = \frac{1}{\left| \omega_r^2 \cdot C_P - \frac{1}{L_P} \right|} = \frac{1}{\left| \frac{1}{L_P \cdot C_P} C_P - \frac{1}{L_P} \right|} = \infty \quad (10)$$

Рівняння (10) показує, що при наближенні до резонансної кутової частоти вимірювана індуктивність починає зростати, і на резонансній частоті з'являється максимум з дуже великою (теоретично – нескінченною) амплітудою. Подальше

збільшення частоти викликає зменшення вимірюваного значення індуктивності. Це друга основа для визначення резонансної частоти. Це означає, що коли при вимірюванні імпедансометром поточний резонанс проявляється появою максимуму при однаковій частоті від частотної залежності індуктивності і мінімум від ємності залежність. Слід підкреслити, що резонанс струмів може виникнути лише тоді, коли одночасно індуктивність і ємності присутні в випробуваному ланцюзі. Відсутність одного з цих компонентів виключає можливість резонансу.

### **5.1.9 Анігіляція позитронів**

Спектрометр часу життя позитронів на основі фотопомножувачів Hamamatsu H3378-50 з BaF2 сцинтиляторами, цифровий блок APU 8002 (TechnoAP Co. Ltd., Японія) та електроніка живлення. Часова роздільна здатність становила 190 пс. Ізотоп  $^{22}\text{Na}$  з активністю 27 мкКі, охоплений між двома 5-мкм Як джерело позитронів використовували товсту титанову фольгу. Досліджувані зразки  $\varnothing$  5 мм покривали позитрон пляма випромінювання ( $\varnothing$  3 мм) з усіх боків. Установка була адекватною, щоб гарантувати, що всі випущені позитрони проникають в зразки і знищуються всередині них, а не в повітрі. Зразок розташовувався попереду сцинтиляторного детектора. Спектри LT при  $3 \times 10^6$  відліках реєстрували та аналізували за допомогою LT програми[61]. Після кожного вимірювання зразки відпалювали протягом 15 хвилин у вакуумі при  $10^6$  Па і повільно охолоджували до кімнатної температури. Були обрані температури  $50^\circ\text{C}$  і  $75^\circ\text{C}$ .

### **5.1.10 Біосумісність**

Дермальні фібробласти людини D6P6 були використані для оцінки цитотоксичності та біосумісності мембран PCL-MXene. Використання первинних клітин із заморожених первинних клітин було схвалено Інститутом експериментальної та клінічної медичної етики, Латвійського університету 6 квітня 2014 р. Мембрани були стерилізовані зануренням в 70% етанол на 30 хв і

промиванням фосфатно-сольовим буфером (PBS) 5 разів по 5 хв. для видалення залишків етанолу. Клітини розмножували у флаконах для культури клітин T75 (Sarstedt, Німеччина) за стандартних умов культивування в Dulbecco's modified Eagle medium/nutrient mixture F-12 (DMEM/F-12 3:1 об'єм/об'єм) з вмістом L-глутаміну, доповненого 100 одиницями  $\text{мл}^{-1}$  пеніциліну та 100  $\text{мкг мл}^{-1}$  стрептоміцину (Thermo Fisher Scientific, США), 2,5  $\text{мкг мл}^{-1}$  амфотерицину В і 10% фетальної бичачої сироватки (повне культуральне середовище клітин) у зволоженій атмосфері з 5%  $\text{CO}_2$  при 37 °C; із оновленням кожні 2-3 дні. Усі реагенти для культивування клітинної культури були придбані у компанії Sigma-Aldrich, США. Круглі зразки  $\varnothing$  5 мм поміщали в 96-лунковий планшет для культивування культури тканин (Sarstedt) і дермальні фібробласти висівали на мембрани з щільністю 10 000 клітин/ $\text{см}^2$  в 100  $\text{мкл}$  повного середовища для культивування клітин. Контролем були засіяні культурою клітин лунки без мембран. Усі зразки та контроль аналізували тричі. Після 24 годин, 10  $\text{мкл}$  (10% об'єму середовища) реагенту ССК-8 (Dojindo Laboratories, Японія) додавали до кожної лунки та інкубували протягом 2 годин при 37 °C. 100  $\text{мкл}$  середовища з кожної лунки переносили в 96-лунковий планшет, а оптичне поглинання вимірювали за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів Tecan Infinite M200 Pro (Tecan Trading AG, Швейцарія) при 450 нм проти 620 нм. Дослідження ССК-8 повторювали на 3-й і 7-й дні. Після останнього дня зразки промивали двічі PBS, фіксували 4% формальдегідом (Sigma-Aldrich, Німеччина) протягом 10 хвилин і пермеабілізували з 0,1% Triton X-100 в PBS з 1% BSA. Ядра дермальних фібробластів фарбували за Hoechst 33342 (Thermo Scientific, США) у розведенні 1:1000, цитоскелет клітини фарбували ActinRed 555 (Thermo Fisher Scientific). Зразки аналізували за допомогою флуоресцентного мікроскопа Nikon Eclipse TI (Nikon, Японія) у каналах DAPI та TRITC.

#### **5.1.11 Антибактеріальні властивості**

Бактерії *Staphylococcus aureus* В 918 та *Escherichia coli* В 926 були отримані з Національної колекції мікроорганізмів (Інститут мікробіології і вірусології

НАНУ, Київ, Україна) та зберігалися в Бактеріальній колекції СумДУ. Мембрани стерилізували шляхом занурення в 70% етанол протягом 30 хв і промивали, як описано вище. Добову культуру бактерій розводили в бульйоні Мюллера-Гінтона (МНВ) до  $10^5$  клітин/мл. Зразки мембран PCL та PCL-MX були інкубовані 24 години в 24-лунковому планшеті, що містив 2 мл/лунку розведеної культури. Планшети інкубували в інкубаторі/шейкер для мікропланшетів (Stat-Fax-2200, Awareness Technology, inc.) при  $37\text{ }^\circ\text{C}$  при постійному струшуванні при 625 об / хв. Лунки з бактеріями без мембран використовували як позитивний контроль, і лунки зі стерильним середовищем - як негативний контроль. Мембрани виймали та обережно промивали сольовим розчином, щоб видалити нещільно фіксовані бактерії. Потім мембрани поміщали в 2 мл PBS і обробляли ультразвуком протягом 2 хв в ультразвуковій ванні (Ultrasonics Co., Шанхай, Китай), щоб відокремити бактерії від поверхонь мембрани. Кількість і життєздатність клітин аналізували шляхом культивування 20 мкл суспензії на поживному агарі при  $37\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 24 годин, як описано [210]. Кількість живих клітин визначали (КУО/мл) з наступним перерахуванням у  $\log_{10}$ . Усі вимірювання проводили в трьох повторах. Аналіз даних щодо біосумісності та антибактеріальних властивостей проводився за допомогою одностороннього аналізу дисперсії (ANOVA) з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism 9.1.1 з  $p < 0,05$ , що означає статистичну значущість.

## **5.2 Результати**

### **5.2.1. Структурно-хімічні властивості**

Після іммобілізації MXene, мембрани отримали характерний темний колір, що становився темнішим із підвищенням кількості шарів MXene (рисунок 3.9). Пошаровий TEM-аналіз показав - це кілька окремих пластівців MXene, що щільно покривають поверхню нановолокна, огинаючи його вигнуту поверхню (рисунок 3.9). Ідентичність MXene було підтверджено EDX-картуванням титану. Карта EDX вуглецю підтвердила органічний склад волокон. Картування EDX також показало наявність слідів фтору в MXene, який зазвичай залишається в

структурі MXene після травлення шару Al з початкової MAX фази плавиковою кислотою. Крім того, SEM-зображення також показали, що поверхня волокон PCL були покриті зморшкуватими пластівцями MXene (рисунок 3.9).

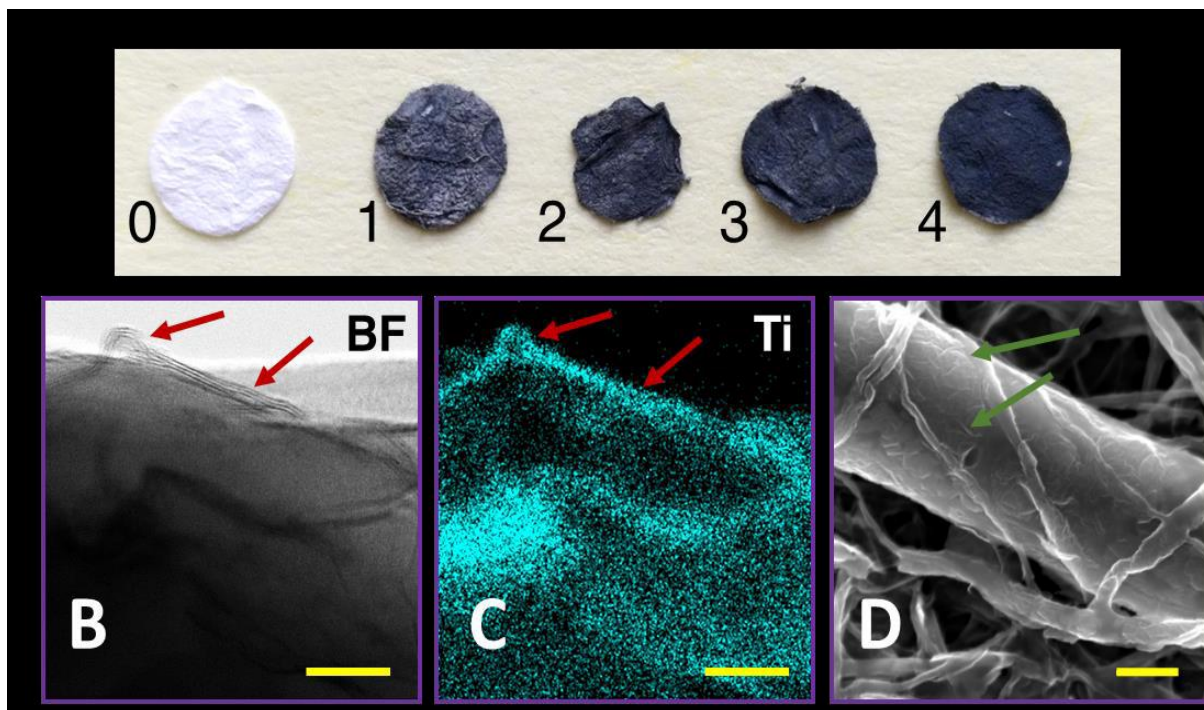


Рисунок 3.9 – Мембрани PCL з іммобілізованими MXene:

А, круглі мембрани  $\varnothing$  5 мм були наклеєні на клейкий папір і сфотографовані при денному світлі; нуль відповідає звичайній PCL мембрані, а 1, 2, 3, 4 позначають зразки PCL-MX-1 до PCL-MX-4 відповідно; В, С, D - візуалізація пластівців MXene на поверхні волокон PCL, де В показує світлопольне TEM-зображення PCL-MX-2 зразок (червоні стрілки вказують на пластівці MXene); С представляє карту EDX, що показує розподіл Ti; D показує SEM зображення ( $\times 15\,000$ ) PCL-MX-2 зразок, де зморшки в пластівцях MXene видно на поверхні волокон PCL (шкала = 1 мкм).

Морфологія поверхні покритих нановолокон змінюється зі збільшенням кількості шарів MXene від 1 до 4. Середня товщина волокна становила  $1,87 \pm 0,56$  мкм, без чіткої залежності від загальної товщини на кількість шарів MXene. Картування EDX показало (рисунок 3.10 і таблиця 2.3), що поверхні нановолокна з іммобілізованим MXene склалися з елементів C, O, Ti, F та Cl, де O був з

нановолокон PCL і кінцевих поверхонь MXene, тоді як Ti і F підтвердили наявність MXene (елементи F і Cl можуть бути пов'язані з протоколами травлення фази MAX і розшарування багатошарового MXene); і C можна знайти як в полімерній основі, так і в MXene. Вміст Ti продемонстрував тенденцію до збільшення кількості шарів MXene (табл. 2.3). Різниця, однак не досягла статистичної значущості, незважаючи на численні (понад 20) точок даних, зареєстрованих для кожного зразка. Це свідчить про те, що поверхневий шар MXene був тонким і неоднорідним, що видно при більш пильному розгляді (рисунок 3.10). Кількісне визначення F і Cl показало граничні значення, які були непослідовними через низьку кількість присутнього F та внутрішню складність техніки EDX для виявлення F завдяки його відносно низькій атомній масі.

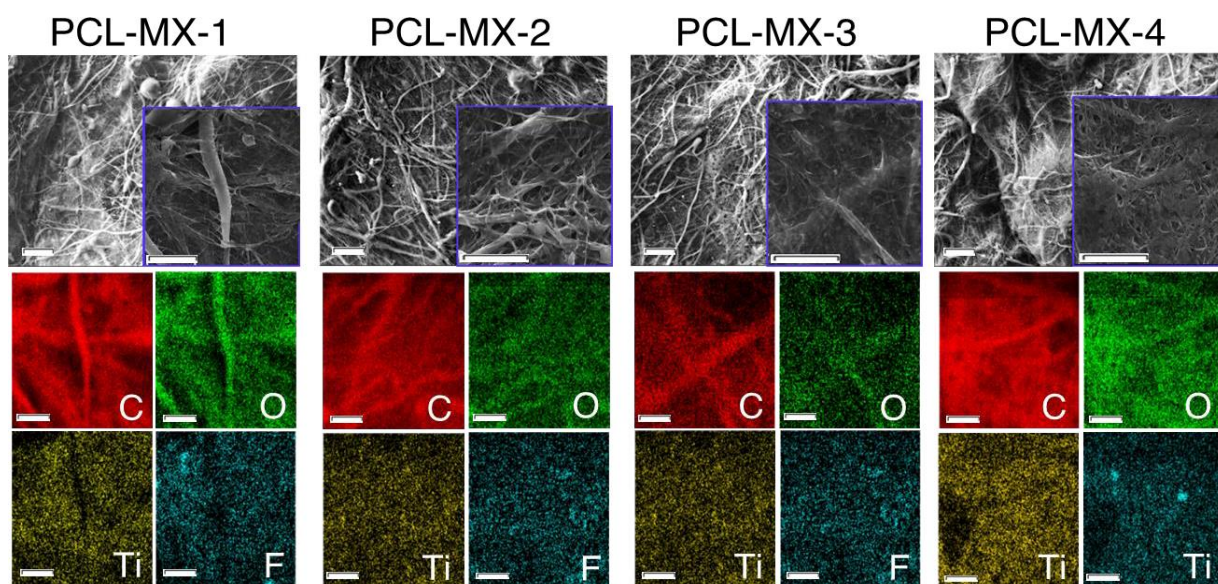


Рисунок 3.10 – Зображення емісії SEM (верхній ряд) показують морфологію поверхні PCL-MXene композитів з різною товщиною шарів MXene, як зазначено вище зображень; нижні панелі показують картування елементів EDX для елементів C, O, Ti та F у композитних нановолоконних мембранах, як зазначено вище. Масштабні шкали = 10 мкм.

ТЕМ у поєднанні з аналізом спектроскопії втрати енергії електронів (EELS) були використані для характеристики наноструктури, фазового складу, морфології, розмірів і хімічного складу поверхневих шарів зразка утвореного



MXene на нановолокнах PCL (рисунок 3.11). TEM з малим збільшенням і кільцеве темне поле під великим кутом зображення (HAADF) скануюча TEM (STEM) зображення показують вид у плані 2D пластівців, що депонуються на підложці для волокон. Спочатку нанопласти покривали поверхню волокон PCL. Вони представляли 2D форми з поперечним розміром від 0,4 мкм до 0,7 мкм. Гексагонально розташовані дифракційні плями на електронній дифракції обраної області (SAED) на цьому зображенні показано монокристалічну структуру MXene.

Таблиця 2.3 – Елементний склад композитів PCL-MXene, виміряний методом SEM за допомогою енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії (у %)

	C	O	Ti
PCL-MX-1	77±4.0	20±2.5	2.3±2.5
PCL-MX-2	77±3.4	19±2.6	2.5±2.3
PCL-MX-3	77±4.0	18±3.5	3.5±4.4
PCL-MX-4	75±4.1	20±2.7	4.1±3.0

Хімічний склад нанопластівців визначали методом EELS. Спектр EELS із втратами серцевини взятий з пластівця, демонструє характерні краї C-K, Ti-L<sub>3,2</sub> і O-K. Титан і карбон є елементами, що входять до хімічного складу частинок MXene. Кількісна оцінка спектрів EELS показали, що MXene складаються з 62,5 ат.% Ti і 37,5 ат.% C, (Ti/C=1,67), що близько до стехіометричного складу Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub> (Ti/C=1,5) MXene.

На рисунку 3.11 показано репрезентативне зображення HRTEM краю наноліста. Верхній візерунок, який було отримано за допомогою процедури швидкого перетворення Фур'є (ШПФ), підтверджує одношаровий MXene на краю нанопластівців. Гексагональний мотив вказує на гексагональну симетрію. Дані взяті з іншого яскравої ділянки показують два накладених один на одного аркуша MXene з відносним поворотом на 8°. Це дає змогу дійти висновку, що

експериментально отримані міжплощинні відстані 0,266 нм і 0,154 нм і кути  $60^\circ$  і  $30^\circ$  між ними, відповідно, добре узгоджуються з даними для міжплощинних відстаней площин типу  $\{10-10\}$  та  $\{11-20\}$  гексагонального MXene  $Ti_3C_2$  ( $a=b=0,3073$ ,  $c=1,5131$  нм).

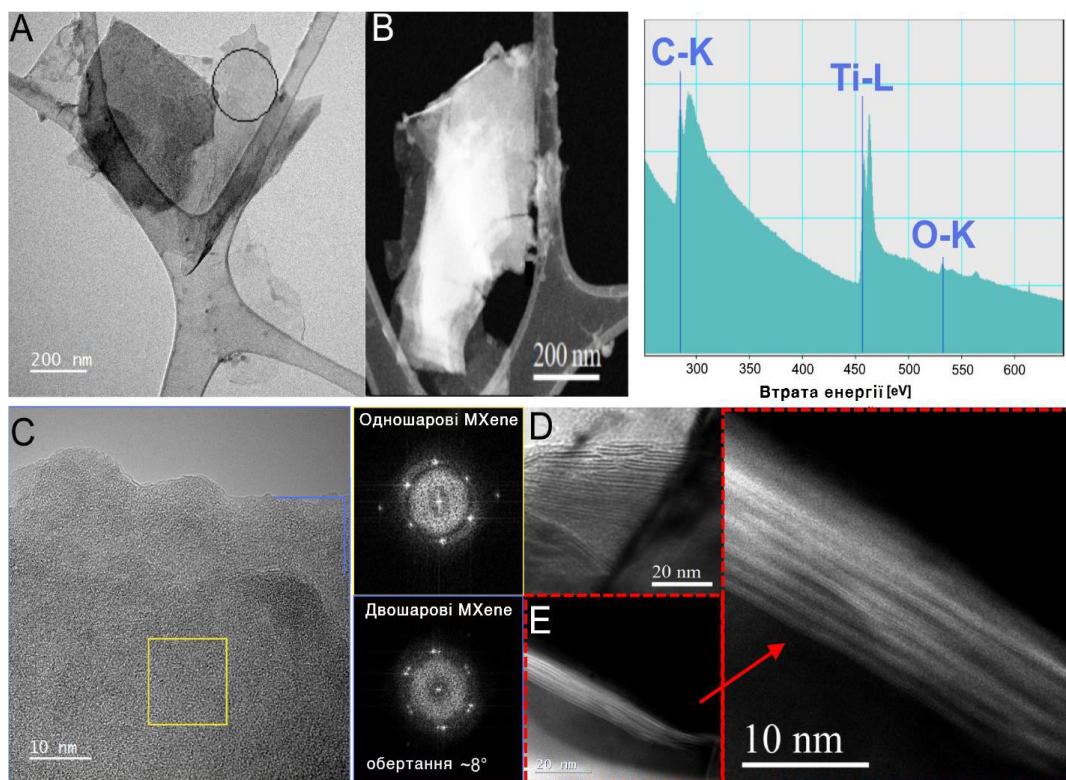


Рисунок 3.11 – А, світлопольне TEM-зображення кластера нанолістів; В, HAADF STEM зображення відшарованих нанолістів, що показують розташування шарів MXene та їх спектр EELS; С, плоский вид HRTEM зображення краю нанопластів; D, вид збоку лістів MXene з кількома шарами нанопластівців; Е, поперечний переріз STEM HAADF, вид багатшарової пластівців загальною товщиною між 8 і 9 нм. Видно нерівномірні зазори між шарами. Білі лінії в ламелях відповідають атомним площинам  $Ti$ .

Зображення поперечного перерізу (перпендикулярно до осі  $c$ ) з високою роздільною здатністю (HR) TEM підтверджує структуру  $Ti_3C_2T_x$  MXene. Одно- та двошарові листи переважали, але також були знайдені багатшарові нанопластівці, що склалися з до 12 листів MXene. Відстань між шарами в багатшарових пластівцях змінювалася від 1,10 нм до 1,36 нм. Товщина

нанопластівців  $Ti_3C_2$  зазвичай було нижче 15,8 нм, залежно від кількості шарів у ламелі. На рисунку 3.11 показано поперечний переріз HAADF STEM-зображення багатошарової нанопласти з нерівномірними проміжками між листами. Товщина нанолістів коливалася між 8 і 9 нм.

На рисунку 3.12 показаний спектр інфрачервоного ослабленого повного відбиття (IR ATR) поверхні мембрани. Всі спектри містять сигнали, характерні для PCL. Піки при 2943 і 2865  $cm^{-1}$  відповідають асиметричним і симетричним пружним коливанням в групі  $CH_2$ . Найвищий пік при 1727  $cm^{-1}$  належить карбонільній групі ( $C=O$ ). Сигнали при 1240 та 1167  $cm^{-1}$  відповідають псевдovпорядкованому розтягуванню  $C-O$  та  $C-C$  у кристалічній фазі PCL. Асиметричні та симетричні розтягуванням зв'язків  $C-O-C$  можуть відповідати піки при 1235  $cm^{-1}$  і 1158  $cm^{-1}$  відповідно; пік при 665  $cm^{-1}$  походить від вібраційної деформації зв'язку  $Ti-O$ ; сигнали при 1096  $cm^{-1}$  і 1395  $cm^{-1}$  відповідають деформаційним коливанням зв'язків  $C-F$  і  $O-H$ , відповідно.

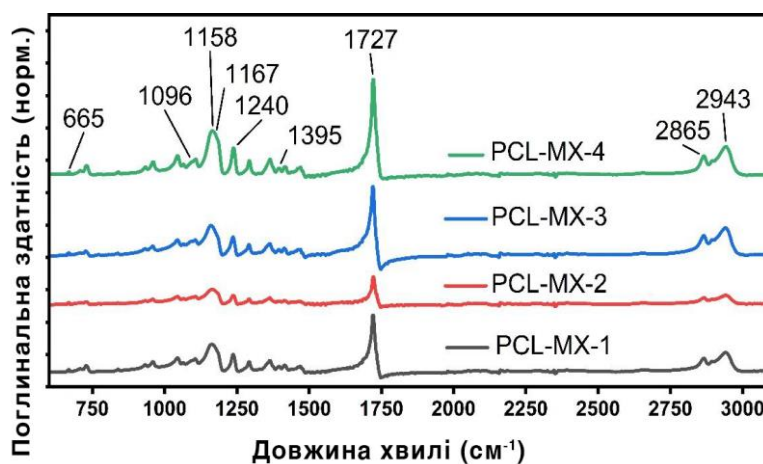


Рисунок 3.12 – ATR-IR спектри мембран PCL-MX

На рисунку 3.13 представлено набір спектрів XPS, записаних із зразка PCL-MX-2. Аналогічні спектри були отримано для зразків PCL-MX-1, PCL-MX-3 та PCL-MX-4. Широкий спектр сканування показує присутність титану (сигнал  $Ti2p$  при приблизно 450 eV), фтору (сигнал  $F1s$  при приблизно 685 eV), вуглецю (сигнал  $C1s$  при бл. 285 eV) і кисень (сигнал  $O1s$  приблизно при 530 eV). Останні два можуть також виникати з т. зв додаткового вуглецю [171]. Спектри високої

роздільної здатності розбиті на основні компоненти, показані на рисунку 3.13, надають додаткові відомості про хімічний склад зразків. Деконволюція області C1s виявляє наявність чотирьох компонентів з максимумами при 281,5, 284,8, 286,3 і 288,7 еВ, які можуть бути віднесені до C–Ti, C–C, C–O та C=O [172] відповідно. Деконволюція спектру високої роздільної здатності Ti2p дає три компоненти з їхніми спін-орбітальними аналогами розщеплення на 454,8, 456,3 та 458,0 еВ, що приписується Ti–C, Ti<sup>3+</sup> і Ti–O [173] відповідно. Компонент Ti<sup>3+</sup> не був присутній у зразку PCL-MX-1. На останньому кроці аналізували спектр O1s. Він складається з трьох компонентів: Ti–O при 529,3 еВ, C=O при 531,7 еВ і C–O при 533,1 еВ. Крім того, у випадку з PCL-MX-1 додатковий компонент при 536,1 еВ був виявлений і віднесений до захопленої міцно зв'язаної води (ОН, з'єднаний з металом, наприклад, у MXenes, зазвичай з'являється при енергії зв'язку до 531-532 еВ). Зокрема, співвідношення між окремими компонентами спектрів високої роздільної здатності узгоджуються між собою.

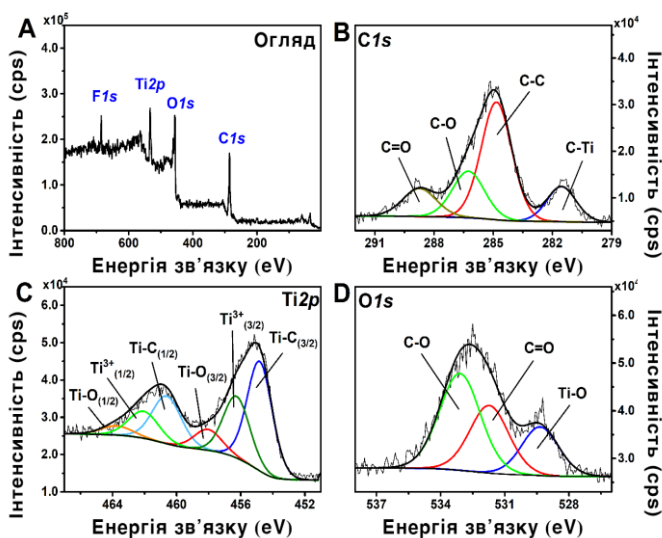


Рисунок 3.13 – XPS аналіз. А, оглядовий спектр і В, спектри високої роздільної здатності C1s; С, Ti2p і D, O1s області енергії, записані для зразка PCL-MX-2.

### 5.2.2 Електропровідність

Встановлено, що PCL-MX мембрани стали електропровідними при ваговому співвідношенні MXene/PCL 3:10 і вище, що призводить до різних мінімумів обох компонентів імпедансу (рисунок 3.14). Як показали попередні аналізи, шари MXene залишалися непровідними в PCL-MX-1 і PCL-MX-2, можливо, через недостатню кількість прямих контактів між MXene, що перекриваються. У той же час PCLMX- 3 і PCL-MX-4 були провідними, причому провідність струму відбувалася за рахунок тунелювання електронів. Ми обрали PCL-MX-3 для подальшого поглибленого вивчення, оскільки провідність була досягнута в цьому матеріалі з мінімальною кількістю MXene. Частотні залежності ємності, виміряної на 3-х обраних температурах, актуальні для низькотемпературного зберігання та кімнатної температури, показані на рисунку 3.14. Значення ємності, виміряні в паралельній еквівалентній схемі, повільно зменшуються зі збільшенням частоти і знаходяться в діапазоні від приблизно  $5 \times 10^{-13}$  пФ до приблизно  $1,5 \times 10^{-13}$  пФ. Такі низькі значення ємності можна пояснити малою площею поверхні та великою товщиною діелектрика досліджуваного зразка. Її глибина становить приблизно один порядок, тоді як її повна ширина на половині максимуму (FWHM) не перевищує  $1 \times 10^4$  Гц. На частотах вище  $10^5$  Гц спостерігалися нерегулярні коливання великої амплітуди, які повністю спотворювали вимірювання. Такі осциляції не спостерігалися в наноструктурованих системах іншого складу [174–176]. Уточнення джерел цих коливань потребує додаткового дослідження, яке виходить за межі цієї роботи. Відповідно, ми зосередилися на аналізі діапазону частот до  $10^5$  Гц. У випадку паралельного RLC-ланцюга, опір якого дорівнює нулю, значення ємності, виміряної при мінімумі повинено дорівнювати нулю, згідно з рівнянням (9). У разі ненульового опору мінімальна глибина має бути меншою. В результаті ємність, виміряна для мінімуму, не досягає нульового значення.

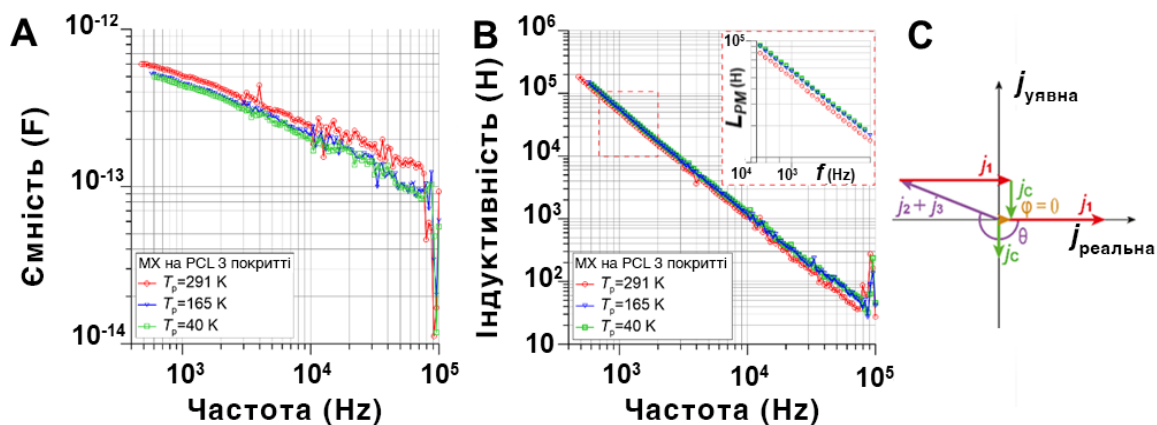


Рисунок 3.14 – Частотні залежності вимірної ємності СРМ PCL-MX-3 при 3-х вибраних температурах. А, частотна залежність індуктивності PCL-MX-3, виміряна паралельно еквівалентна схема; Б, індукційна діаграма густини струму при резонансі струму:  $j_1$ ,  $j_2 + j_3$  це щільності струму, створені тунелюванням.  $j_c$  – ємнісний струм,  $\theta = -\omega \cdot \tau$  – кут між векторів  $j_1$  та  $(j_2 + j_3)$ ,  $\varphi = 0^\circ$  – кут зсуву фази (показано на С).

На рис. 3.14 показано частотну залежність вимірної індуктивності  $L_{PM}$  PCL-MX-3 при 3-х вибраних температурах. Він характеризується мінімумом на частотних залежностях  $L_{PM}(f)$  приблизно на  $8 \times 10^4$  Гц. Його амплітуда становить приблизно один порядок величини, тоді як його FWHM становить приблизно  $1 \times 10^4$  Гц. Виміряна індуктивність в максимумі, за відсутності опору в ланцюзі, згідно з формулою (10) має становити нескінченність. Наявність опору призводить до подальшого зменшення амплітуди до мінімуму. Порівняння залежності ємності та індуктивності показують, що частота, на якій виникає максимальна індуктивність точно збігається з частотою мінімуму появи для вимірюваної ємності. Рівняння (9), (10) і (4) показують, що це частота, на якій виникає резонанс струмів. Це означає, що в PCL-MX-3 є як ємнісні, так і індуктивні компоненти, подібні до ряду системи, що містять наночастинки провідної фази в діелектричній матриці [177–181].

У звичайних ланцюгах RLC індуктивність, як правило, має форму котушки. Результати свідчать про те, що покриття MXene на неоднорідних мембранах з нановолокна потребують певної кількості шарів для утворення

суцільної плівки. Ми зробили висновок, що лише PCL-MX-3 і PCL-MX-4 мали достатню площинну щільність шарів MXene для досягнення значного рівня провідності по всьому волоконному мату. Провідність мала квантовий характер, створюючи електрони, що стрибають через потенційні ями. PCL-MX-3 мав як ємнісні, так і індуктивні компоненти, як матеріал, що містить провідні наноструктури ( $Ti_3C_2T_x$  MXene) в діелектричній матриці (PCL). Потік синусоїдального струму був викликаний електронними ямами нанометрового розміру, розподіленими на нанометрові відстані (проміжки між шарами 2D MXene). З точки зору тканинної інженерії, нейрон канали вимагають як високої провідності, так і біосумісності [182]. Крім того, електропровідні біоматеріали можуть використовуватися для стимулювання біологічної функції клітин, зокрема диференціації стовбурових клітин [183]. На додачу, канали повинні імітувати складну топографічну структуру нервових волокон [184]. Не менш важливою є рівномірність і стабільність електричних властивостей по всій площі мембрани. Взагалі, детально знання про мікро- та наноструктури як на внутрішній, так і на зовнішній поверхні каркасів будуть корисними у проектуванні ефективних і безпечних кондуїтів.

### 5.2.3 Позитронна анігіляція

На рис. 3.15 показано залежності різних компонентів тривалості життя від температури відпалу. Середній час життя позитронів був визначений як:

$$\bar{\tau} = \tau_1 I_1 + \tau_2 I_2 ,$$

де  $\bar{\tau}_{1,2}$  – компоненти часу життя позитронів,

$I_{1,2}$  – відповідні інтенсивності.

У кожній процедурі підгонки значення  $\chi^2$  завжди було близьким до 1. На рис. 3.15 В, С показано, що збільшення кількості шарів  $Ti_2C_3T_x$  на полімері призводить до зміни середнього часу життя позитронів від 0,58 нс до 0,71 нс у

випадку PCL-MX-3. Таким чином, можна сказати, що кількість дефектів у  $Ti_3C_2T_x$  MXene зростає зі збільшенням кількості шарів MXene на PCL підкладці. Крім того, можливе утворення кластерів вакансій (пор), що збільшує середнє значення часу життя до 0,7 нс. Розкладання спектрів часу життя позитронів на складові показало, що час життя  $\tau_2$  збільшився з 1,87 нс до 2,07 нс, що може бути пов'язано або з розміром кластера вакансій, або з розміром нановоїда. Відпал у вакуумі при  $75^\circ C$  видаляє воду та адсорбовані гази, захоплені в порах MXene [185] та призводять до значного зниження інтенсивності другої складової  $\tau_2$  з 21% до 10%. Тому деякі позитрони анігілюють переважно на основних електронах MXene. Збільшення кількості MXene шарів від 1 до 4 призводить до незначної зміни властивостей основи PCL-MXene. Ці зміни є пов'язані з провідністю (залежність ємності та індуктивної (частоти)), а також розповсюдження в значення достовірного інтервалу. Результатом є збільшення кількості шарів від PCL-MX-1 до PCL-MX-4 у більш стабільній передачі потужності в діапазоні низької та середньої потужності.

Коли температура ізохронного відпалу зразків PCL-MX-3 у вакуумі досягла близької до  $75^\circ C$  відбулися зміни провідності та дефектної структури в проміжках між пластівцями  $Ti_3C_2T_x$ , які були відображені в спектрах позитрона LT. Основна зміна, яка очікується при цій температурі випаровування захопленої води, що відкриває пори, збільшує розмір дефектів і зменшує інтенсивність складових часу життя  $\tau_1$  та  $\tau_2$ .



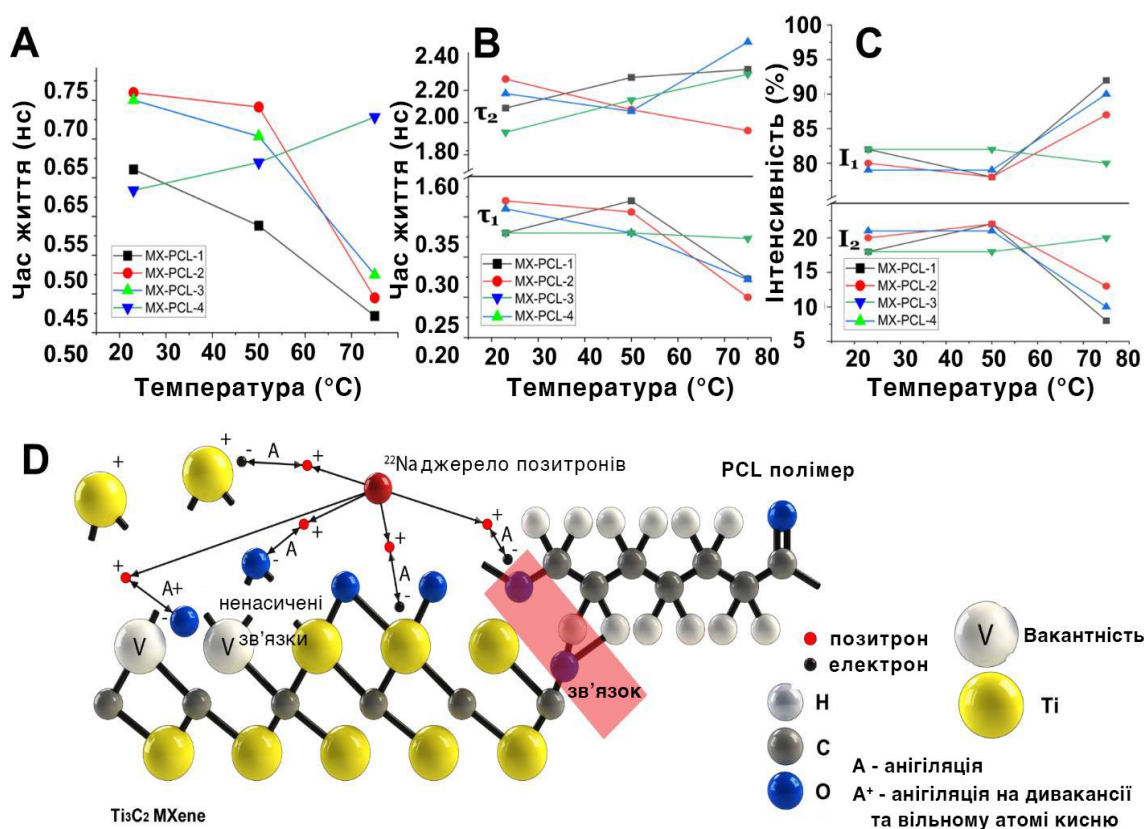


Рисунок 3.15 – Температурні залежності середнього часу життя позитронів композитів PCL-MXene, де A показує температура ізохронного відпалу; B, LT компоненти; C — їх інтенсивності; і D, передбачуваний позитрон модель взаємодії з композитом PCL-MXene.

На рис. 3.15 запропоновано модель можливої взаємодії позитронів всередині MXene-полімерного композиту. За допомогою процедури фіксації компонентів [185] було встановлено, що значення  $\tau_1$  становить близько 250 пс. Припускаючи це цей компонент пов'язаний із часом життя позитронів у комплексі – дивакансія плюс міжвузловий атом або два міжвузлових атомів O та вакансії на поверхні пластівця MXene, інша частина цього LT повинна бути пов'язані з анігіляцією позитронів на первинних електронах. Відповідно до літератури [186–188], комплекси дивакансія + кисень більш імовірно утворюються при вищих температурах [189]. Висячі облігації також покращують адгезію на межі [190,191]. Поряд з атомами O в MXene і в MXene-полімері на поверхні MXene також є атоми F (за результатами ІЧ ATR, SEM та XPS аналізи), а його час життя  $\tau_1=270\pm 370$  пс. Оцінки показують, що кількість (концентрація)

таких дефектів не перевищує  $5 \times 10^{17}$  см<sup>-3</sup>, оскільки лише не більше 15% позитронів імпантується та анігілюється в MXene або поблизу перехідного шару. Враховуючи, що ефективність захоплення позитронів вакансіями вище, ніж у нанопор у полімері, анігіляція в основному відбуватиметься на дефектах у MXene та на межі розділу, потім у нанопорах і, зрештою, на решті електронів підкладки. MXene можуть утворювати оболонку навколо полімерних волокон і забезпечувати їх гарну провідність, але на поверхнях з накладним покриттям адгезія до полімеру є важливою, оскільки це може впливати на обмін електричними зарядами на межі розділу.

#### **5.2.4 Контактний кут**

Основна проблема використання синтетичних полієфірів у біомедичних цілях полягає в їх низькій здатності для підтримки прикріплення клітин завдяки їх гідрофобній природі. Подібним чином мембрани PCL мають внутрішню гідрофобність, яка перешкоджає ефективному посіву клітин з активним перегрупуванням клітин. Це обмежує використання скафолдів PCL. Тому гідрофільність поверхонь скафолдів є одним з найбільш важливих факторів, які слід враховувати при виготовленні біосумісних мембран [192]. Для адгезуючих клітин, взаємодія з компонентами позаклітинного матриксу впливає на клітинну адгезію, міграцію та морфологію. Фокальні спайки (FAs) є точками контакту клітини з позаклітинним матриксом. Ці складні структури регулюють зв'язок клітини з навколишнім позаклітинним середовищем. Передача сигналів через FA регулює різноманітні клітинні процеси, включаючи проліферацію, міграцію, апоптоз, поширення та диференціацію [193]. Таким чином, контроль фокальної адгезії є першочерговим питанням у виготовленні скафолдів. Для поліпшення поверхневих властивостей полімерів застосовувалися різні методи, такі як поверхневі покриття, плазмова обробка, поверхневий гідроліз, фотоіндуковане щеплення, лазерна обробка, тощо [194]. Вимірювання контактного кута з водою підтвердило контактну гідрофобну природу оригінальної електропряденої мембрани PCL ( $130 \pm 3$  градуси). Важливо, що іммобілізація MXene на волокнах

PCL призвело до значного зменшення контактного кута в PCL-MX-1 і PCL-MX-2 з меншим ефектом після 3-го та 4-го покриттів (рисунок 3.15). Однак, статичний контактний кут мембран PCL-MX-1 і PCL-MX-2 все ще перевищував 90 градусів. Потім ми виміряли динамічний контактний кут, щоб дослідити динаміку поглинання краплі води мембранами. Динамічний контактний кут оригінальної мембрани PCL не змінювалася протягом 2 секунд і коливався від 125 до 145 градусів. Одноразове та дворазове напилення MXene призвело до значного зменшення контактного кута до 91 та 43 градусів відповідно. Однак збільшення кількості шарів MXene до 3 і 4 не зменшило далі динамічний контактний кут. Раніше було показано, що лужна попередня обробка PCL мембрани з рівномірним розподілом MXenes по волокнах призвело до збільшення -ОН і -COОН функціональні групи, які посилюють Н-зв'язок, а також підвищують гідрофільність [192]. Ми зробили такий висновок, що надмірне осадження MXene (більше 3 шарів) може збільшити шорсткість поверхні, що може вплинути на контактний кут.

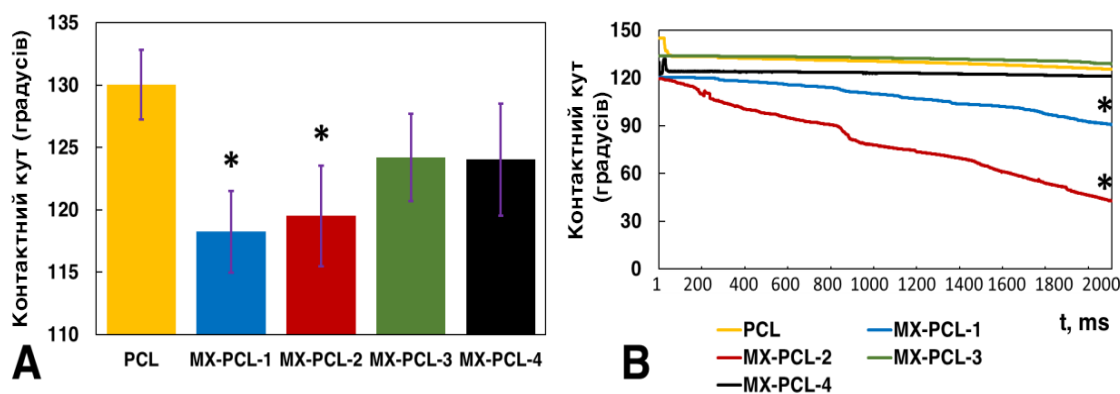


Рисунок 3.15 – А - статичні та В - динамічні дані контактного кута на мембранах PCL та PCL-MX. Зірочки позначають значні відмінності між оригінальними скаффолдами PCL і PCL-MX при  $p \leq 0,05$ .

Структура та хімічні властивості композитних матеріалів мають важливе значення для застосування в біомедичній галузі, де необхідно враховувати баланс між структурою, функцією та безпекою. Скаффолд для тканинної

інженерії має служити підтримкою для розвитку тканин і відтворювати функцію органів-мішеней. Кілька публікацій продемонстрували можливість застосування MXene для тканинної інженерії. Однак досі немає розуміння того, як структурні і хімічні властивості MXenes пов'язані властивостями скафолдів [160–163]. Проектування струмопровідних матеріалів для регенерація тканин вимагає тісного поєднання їх точних структурних характеристик, а також їх електропровідності і біосумісності. Ми демонструємо, що шари MXene щільно покривають поверхню нановолокон PCL мембрани. Провідність була забезпечена оптимізованою кількістю шарів MXene, як це видно в PCLMX-3 та зразках PCL-MX-4. Хімічний склад поверхні MXene забезпечує сприятливе середовище для розробки гідрофільних матеріалів, необхідних для прикріплення та проліферації клітин. Водночас анігіляція позитронів демонструє, що щільність нанорозмірних дефектів збільшується зі збільшенням кількості шарів MXene на підкладці PCL. Це може вплинути на антибактеріальні властивості. Однак вони також можуть бути пов'язані з підвищеною цитотоксичністю внаслідок, наприклад, утворення активних форм кисню. Тому була проведена біологічна оцінка, враховуючи необхідність чіткого зв'язку між структурними, хімічними та біологічними властивостями з акцентом на застосування нових композитів PCL-MXene як електропровідних скафолдів для регенерації тканин.

### **5.2.5 Біологічні властивості**

Незважаючи на внутрішні недоліки PCL, він продемонстрував достатню біосумісність у багатьох попередніх дослідженнях, особливо в комбінації з іншими агентами [195,196]. Однак з додаванням наноматеріалів, було показано, що наночастинки срібла та міді або вуглецеві нанотрубки зменшують адгезію клітин і їх проліферацію [197]. Осадження MXene на електропрядених волокнах PCL збільшило провідність мембран, що має важливе значення в тканинній інженерії нервової та серцевої тканин. Проте біосумісність є основною вимогою до біоматеріалів [198].

Експерименти з фібробластами людини продемонстрували відповідну адгезію клітин як на PCL волокна, так і на волокна PCL з додаванням MXene (рисунок 3.16). Під час 7-денного експерименту швидкість проліферації клітин на мембранах PCL-MX-2 та PCL-MX-3 була значно вищою порівняно з волокнами PCL ( $p \leq 0,05$  та  $p \leq 0,01$  відповідно). Також ці PCL-MX мембрани показали кращу змочуваність (менший контактний кут) порівняно з іншими композитами та контрольним зразком PCL. Це свідчить про те, що іммобілізовані шари MXene полегшують адгезію та розподіл клітин за допомогою механізму взаємодії поверхонь з позаклітинним матриксом, що призводить до кращої проліферації клітин [199]. Як показало SEM дослідження, обидва композити PCL-MX-2 і PCL-MX-3 показали рівномірний розподіл MXene, що призвело до збільшення площі активної поверхні мембран. Разом із гідрофільною природою MXene і його великою площею поверхні з активними OH- і O- групами, ці фактори забезпечують адекватне середовище для клітинної адгезії та проліферації [200]. Флуоресцентна мікроскопія (рисунок 3.16) продемонструвала однорідність розподілу фібробластів як на вільних PCL, так і на композитах PCL-MX з підвищеним вирівнюванням клітин вздовж нановолокон на PCL-MX-2 і PCL-MX-3.

Для оцінки антибактеріальних властивостей електропрядених мембран PCL з нанесеним MXene був застосований модифікований тест в динаміці спостереження [201]. Бактеріальну адгезію та утворення біоплівки оцінювали на 6 і 24 години культивування в бактеріальних суспензіях.

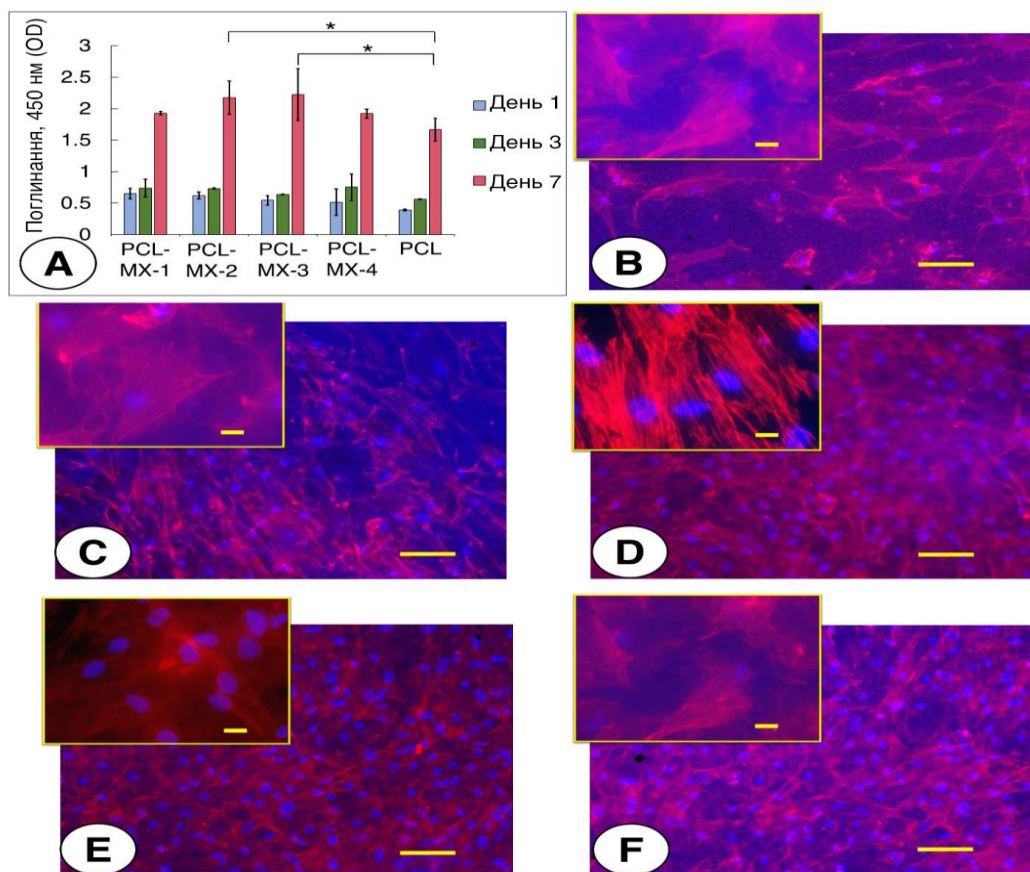


Рисунок 3.16 – А, дані аналізу ССК-8 щодо проліферації дермальних фібробластів людини протягом 7-денного експерименту; В-Ф, флуоресцентні зображення ядер (синій) і фарбування цитоскелету (червоний) на 7-й день культур на мембранах з різною кількістю нанесених шарів, де В – вільний PCL; С, PCL-MX-1; D, PCL-MX-2; E, PCL-MX-3; F, PCL-MX-4. Збільшення основних зображень x100 (масштаб = 100 мкм), а на вставках – x400 (шкала = 20 мкм). Зірочки в А позначають значні відмінності між даними ССК-8 для PCL та відповідних мембран PCL-MX ( $p \leq 0,05$ ).

Результати показали, що покриття MXene призвело до зниження адгезії бактерій до мембран PCL як для грампозитивних, так і для грамнегативних бактерій. Це відповідало спостережуваним змінам у морфології та змочуваності нановолокна. Таким чином, PCL-MX-2 і PCL-MX-3 були значно менш адгезивними для *S.aureus* ( $p < 0,05$ ) ніж мембрана PCL після 6 годин культивування. Причому MX-PCL-2 показав значно вищу антиадгезивну здатність до *E.coli* ( $p < 0,05$ ) порівняно зі зразком PCL через 6 та 24 години

(рисунок 3.17). Збільшення кількості шарів MXene (PCL-MX-4) не сприяло запобіганню адгезії бактерій. Це дозволяє припустити, що антибактеріальні властивості залежать не тільки від хімічного складу поверхні, а й від морфології плівки, оскільки MXene із зразками PCL-MX-2 і PCL-MX-3 є найбільш придатними для запобігання бактеріальній адгезії через здатність тонкого шару MXene на поверхні мембрани пригнічувати адгезію та ріст бактерій. Раніше було показано, що прямі фізичні контакти бактеріальних клітин з гострими кінцями MXene та  $\text{TiO}_2$  викликають фізичні пошкодження та зміни клітинних мембран завдяки гідрофільності поверхні  $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$ . Крім того,  $\text{TiO}_2$  індукує окислювальний стрес на поверхні бактерій через можливе утворення радикалів [202]. PCL мембрани з двома та трьома шарами покриття MXene продемонстрували підвищену здатність запобігати утворенню біоплівки обох бактерій. Проте, додатковий шар покриття MXene не призвів до подальшого збільшення антибактеріальної ефективності.

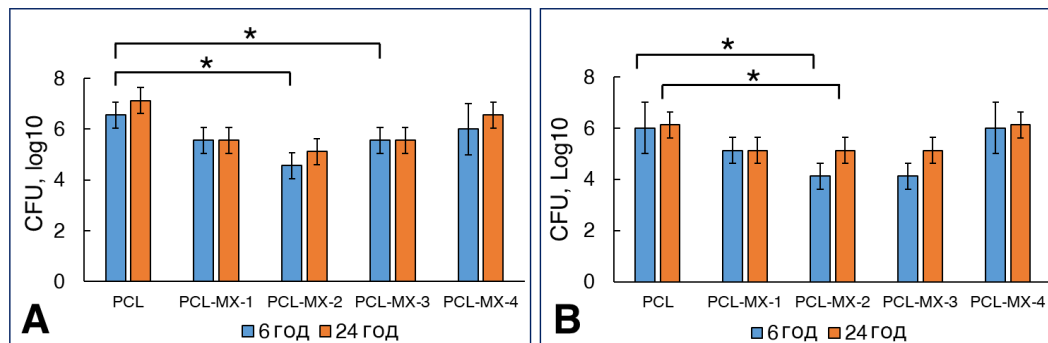


Рисунок 3.17 – Антибактеріальна ефективність мембран PCL, покритих MXene, через 6 годин і 24 години культивування із *S. aureus* (A); із *E. coli* (B).

## ВИСНОВКИ

1. Засоби на основі хітозану демонстрували значну гемостатичну ефективність, помірний темп біодеградації та високу біосумісність *in vitro*. Електроспінінг значно збільшує пористість матеріалу та активну поверхню на відміну від Ch-аерогелю та ChSp.

2. Хітозанові електроспінінгові мембрани продемонстрували високу біосумісність та рівень біодеградації, значну гемостатичну ефективність, але низькі антибактеріальні властивості порівняно із хітозановими губками та аерогелями.

3. Дослідження *in vivo* підтвердили поглиблене відновлення печінки при використанні електроспінінгових мембран, що забезпечує можливості для їх застосування з метою управління вісцеральними кровотечами.

4. Гістологічні та імуногістохімічні аналізи довели, що застосування Ch-аерогелю для зупинки печінкової кровотечі асоціюється з помірною запальною реакцією та виявляє повільну деградацію. Проте хітозановий аерогель можна ефективно застосовувати у якості гемостатичного пластиру завдяки високій антибактеріальній активності, але його застосування вісцерально є обмеженим через помірний запальний ефект та повільну деградацію.

5. Вироблений електроспінінгом Ch-кополімер продемонстрував високу біологічну сумісність та швидкість деградації *in vivo*, що забезпечує можливості для його застосування для управління вісцеральними кровотечами.

6. Мембрани Ch, навантажені з AgNP, продемонстрували вищу антибактеріальну активність (швидкість зниження КУО), ніж незавантажені зразки. Потрібно зазначити, що кількість наночастинок срібла, необхідна для запобігання прикріпленню та колонізації бактерій, не перевищувала  $\frac{1}{2}$  -1 MIC. Крім того, було помічено, що застосування наночастинок срібла пригнічувало утворення біоплівки як *S. aureus*, так і *E. coli*. Таким чином, стратегія покращення антимікробних властивостей Ch мембран з використанням інших



антибактеріальних агентів може бути реалізована шляхом включення наночастинок срібла.

7. Нейтралізація хітозанових нановолокнистих мембран TFA/DCM в 1M розчині NaOH зберігала пористу структуру та забезпечувала їх нерозчинність у нейтральних або основних водних середовищах. Постнейтралізовані хітозанові нановолокнисті мембрани демонструють високу біосумісність і забезпечують відповідне середовище для проліферації клітин. Наночастинки срібла не впливають на біосумісність, але забезпечують значний антибактеріальний ефект проти грамнегативних і грампозитивних бактерій. Мембрани хітозан-TFA/DCM, інкорпоровані наночастинами срібла, можуть бути перспективним матеріалом для тканинної інженерії з відповідним рівнем біосумісності і високою антимікробною здатністю після нейтралізації лугом.

8. Композитні мембрани полікапролактон-MXene мають як індукційні, так і ємнісні властивості. Параметри індуктивності та ємності провідності мають максимум і мінімум, відповідно, на тій самій частоті приблизно  $8 \times 10^4$  Гц. Провідність у композиті PCL-MX може пояснюватися тунелюванням електронів між сусідніми потенційними ямами (шарами MXene). Це призводить до формування реальних і уявних складових струму і, таким чином, індуктивних властивостей. Позитрон анігіляційний аналіз виявив наявність дефектів у структурі нанесених шарів MXene, які корелюють з біологічними властивостями композиту PCL-MX. Кількість нанесених шарів MXene є важливим параметром для створення композитних матеріалів полімер-MXene. Два-три шари MXene, нанесені на електропрядені волокна PCL, є оптимумом, який надає перевагу клітинам для прикріплення та проліферації у поєднанні з антибактеріальним ефектом.

**ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ**

1. Virdis F. et al. Clinical outcomes of primary arterial embolization in severe hepatic trauma: A systematic review, *Diagn. Interv. Imaging.* – 2019. – Vol. 100, Issue 2. – P. 65–75.
2. Cimbanassi S. et al. Nonoperative management of abdominal solid-organ injuries following blunt trauma in adults: Results from an International Consensus Conference. *J. Trauma Acute Care Surg.* – 2018. – Vol. 84, Issue 3. – P. 517–531.
3. Carver D. et al. A Prospective Evaluation of the Utility of a Hybrid Operating Suite for Severely Injured Patients: Overstated or Underutilized? *Ann. Surg.* – 2020. – Vol. 271, Issue. 5. – P. 958–961.
4. Gaski A. et al. Decreased mortality, laparotomy, and embolization rates for liver injuries during a 13-year period in a major Scandinavian trauma center. *Trauma Surg. Acute Care Open.* – 2018. – Vol. 3, Issue 1, – P. 1–6.
5. Afifi, Abayazeed et al. Blunt liver trauma: a descriptive analysis from a level I trauma center. *BMC Surg.* –2018. – Vol. 18, Issue 1. – P. 42.
6. Kodadek L. M. et al. Intrahepatic Balloon Tamponade for Penetrating Liver Injury: Rarely Needed but Highly Effective. *World J. Surg.* – 2019. – Vol. 43, Issue 2 – P. 486–489.
7. Huang L. et al. Advances in Topical Hemostatic Agent Therapies: A Comprehensive Update. *Adv. Ther.* – 2020. – Vol. 37, Issue 10. – pp. 4132–4148.
8. Wang L., et al. Hemostatic nanotechnologies for external and internal hemorrhage management. *Biomater. Sci.* – 2020. – Vol. 8, Issue 16.–. pp. 4396–4412.
9. Tompeck J. et al., A comprehensive review of topical hemostatic agents: The good, the bad, and the novel. – 2020. – Vol. 88, Issue 1. – P. 136–141.
10. Liu Y. et al. A systematic review and meta-analysis of associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) versus traditional staged hepatectomy. *Medicine (Baltimore).* – 2019. – Vol. 98, Issue 15 – P. e15229.
11. Hu Z., et al. Chitosan-Based Composite Materials for Prospective Hemostatic Applications. *Mar. Drugs.* – 2018. – Vol. 16, Issue 8. – P. 273.

12. Rad T. et al. Conducting scaffolds for liver tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* – 2014. – Vol. 102, Issue 11. – P. 4169–4181.
13. Rodríguez-Vázquez M. et al. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Res. Int.* – 2015. – Vol. 2015. – Article ID 821279.
14. Hattori H. and Ishihara M. Changes in blood aggregation with differences in molecular weight and degree of deacetylation of chitosan. *Biomed. Mater.* – 2015. – Vol. 10, Issue 1. – P. 15014, 2015.
15. Khan M. A. and Mujahid M. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 124. – P. 138–147.
16. Sun J., Perry S. L., and Schiffman J. D. Electrospinning Nanofibers from Chitosan/Hyaluronic Acid Complex Coacervates. *Biomacromolecules.* – 2019. – vol. 20, Issue 11.– P. 4191–4198.
17. Ding J. et al. Electrospun polymer biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* – 2019. – Vol. 90. – P. 1–34.
18. Xie X. et al. Electrospinning nanofiber scaffolds for soft and hard tissue regeneration. *J. Mater. Sci. Technol.* – Vol. 59. – P. 243–261.
19. Butler N. and Toogood G. Principles of liver resection. *Surg.* – 2017. – Vol. 35, Issue 12. – P. 692–699.
20. Hickman D. S. A. et al. Biomaterials and Advanced Technologies for Hemostatic Management of Bleeding. *Adv. Mater.* –2018. – Vol. 30, Issue 4. – P. 1–40.
21. Hickman D. S. A. et al. Biomaterials and Advanced Technologies for Hemostatic Management of Bleeding. *Adv. Mater.* –2018. – Vol. 30, Issue 4. – P. 1–40.
22. Wang B., Johnson A., and Li W. Development of an Extracellular Matrix Enriched Gelatin Sponge for Liver Wound Dressing. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* – 2020. – Vol.108, Issue10. – P. 2057-2068.
23. Liu J. Y. et al. Hemostatic porous sponges of cross-linked hyaluronic acid/cationized dextran by one self-foaming process. *Mater. Sci. Eng. C* – 2020. – vol. 83, Issue 2. – P. 160–168.

24. Seo Y. B. et al. In vitro and in vivo evaluation of the duck's feet collagen sponge for hemostatic applications. *J. Biomater. Appl.* –2017. – Vol. 32, Issue 4. – P. 484–491.
25. Slezak P. et al. An Efficacy Comparison of Two Hemostatic Agents in a Porcine Liver Bleeding Model: Gelatin/Thrombin Flowable Matrix versus Collagen/Thrombin Powder. *J. Investig. Surg.*, –2019. – Vol. 2019. – P. 828-838.
26. Khan M. A. and Mujahid M. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* –2019. – Vol. 124. – P. 138–147.
27. Wang Y. et al. Hemostatic Ability of Chitosan-Phosphate Inspired by Coagulation Mechanisms of Platelet Polyphosphates. *Macromol. Biosci.* – 2018. – Vol. 18, Issue 4. – P. 1700378.
28. Shariatnia Z. Pharmaceutical applications of chitosan. *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2018. – Vol. 263. – P. 131–194.
29. Ouyang Q. et al. Construction of a composite sponge containing tilapia peptides and chitosan with improved hemostatic performance. *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – Vol. 139. – P. 719–729.
30. Okada T. et al. A biomimetic approach to hormone resistant prostate cancer cell isolation using inactivated Sendai virus (HVJ-E) *Biomater. Sci.* – 2016. – Vol. 4, Issue 1. – P. 96–103.
31. Huang X. et al. Using absorbable chitosan hemostatic sponges as a promising surgical dressing. *Int. J. Biol. Macromol.* – 2015. – Vol. 75. – P. 322–329.
32. Lan G. et al. Chitosan/gelatin composite sponge is an absorbable surgical hemostatic agent. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* – 2015. – Vol. 136. – P. 1026–1034.
33. Zhang W., Sun Y.-L. and Chen D.-H. Effects of Chitin and Sepia Ink Hybrid Hemostatic Sponge on the Blood Parameters of Mice. *Mar. Drugs.* – 2014. – Vol. 12, Issue 4. – P. 2269–2281.

34. Qian Z. et al. A porous sodium polyacrylate-grafted chitosan xerogel for severe hemorrhage control synthesized from one-pot reaction. *J. Mater. Chem. B.* – 2017. – Vol. 5, Issue 25. – P. 4845–4851.
35. Pogorielov M. et al. Haemostatic chitosan coated gauze: In vitro interaction with human blood and in-vivo effectiveness. *Biomater. Res.* – Vol. 19, Issue 1. – P. 1–10.
36. Radwan-Pragłowska J. et al. Chitosan-Based Bioactive Hemostatic Agents with Antibacterial Properties–Synthesis and Characterization. *Molecules.* – Vol. 24, Issue 14. – P. 2629.
37. Kang P. L. et al. Development and assessment of hemostasis chitosan dressings. *Carbohydr. Polym.* –2011. – Vol. 85, Issue 3. – P. 565–570.
38. Qasim S. et al. Electrospinning of Chitosan-Based Solutions for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, Issue 2. – P. 407.
39. Sun J., Perry S. L. and Schiffman J. D. Electrospinning Nanofibers from Chitosan/Hyaluronic Acid Complex Coacervates. *Biomacromolecules.* – 2019. – Vol. 20, Issue 11. – P. 4191–4198.
40. Rasouli R., Barhoum A., Bechelany M. and Dufresne A. Nanofibers for Biomedical and Healthcare Applications. *Macromol. Biosci.* – 2019. – Vol. 19, Issue 2. – P. 1–27.
41. Hu Z. et al. Chitosan-Based Composite Materials for Prospective Hemostatic Applications. *Mar. Drugs.* – 2019. – Vol. 16, Issue 8. – P. 273.
42. Barhoum, Pal K. et al. Nanofibers as new-generation materials: From spinning and nano-spinning fabrication techniques to emerging applications. *Appl. Mater. Today.* –. 2019. – Vol. 17. – P. 1–35.
43. Zhou Y. et al. Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* –2013. – Vol. 53. – P. 88–92.
44. Yi B. et al. Fabrication of high performance silk fibroin fibers: Via stable jet electrospinning for potential use in anisotropic tissue regeneration. *J. Mater. Chem. B.* – Vol. 6, Issue 23. – P. 3934–3945.

45. Casanova M. R., Reis R. L., Martins A. and Neves N. M. The Use of Electrospinning Technique on Osteochondral Tissue Engineering. *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2018. – Vol. 1058. – P. 247–263.
46. Lin Y. et al. In vitro behavior of tendon stem/progenitor cells on bioactive electrospun nanofiber membranes for tendon-bone tissue engineering applications. *Int. J. Nanomedicine.* – 2019. – Vol. 14. – P. 5831–5848.
47. Ye H. et al. Enhanced osteogenesis and angiogenesis by PCL/chitosan/Sr-doped calcium phosphate electrospun nanocomposite membrane for guided bone regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2019. – Vol. 30, Issue 16. – P. 1505–1522.
48. Luo J. et al. Fabrication and characterization of Chinese giant salamander skin composite collagen sponge as a high-strength rapid hemostatic material. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2019. – Vol. 30, Issue 4. – P. 247–262.
49. Li D., Li P., Zang J. and Liu J. Enhanced hemostatic performance of tranexamic acid-loaded chitosan/alginate composite microparticles. *J. Biomed. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 981321.
50. Takagi T. et al. Two-layer sheet of gelatin: A new topical hemostatic agent. *Asian J. Surg.* – 2018. – Vol. 41, Issue 2. – P. 124–130.
51. Che C. et al. Surface-Adaptive and On-Demand Antibacterial Sponge for Synergistic Rapid Hemostasis and Wound Disinfection. *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2020. – Vol. 6, Issue 3. – P. 1776–1786.
52. Jana S, Jana S, Yilmaz Atay H. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems Functional Chitosandrug Delivery and Biomedical Applications. – 2020. – Vol.1. – P. 457-489.
53. Tzur et al. Platelet distribution width: a novel prognostic marker in an internal medicine ward. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.* – 2019. – Vol. 9, Issue 6. – P. 464–470.
54. Mori T. et al. Mechanism of macrophage activation by chitin derivatives. *J. Vet. Med. Sci.* – 2005. – Vol. 67, Issue 1. – P. 51–56.
55. Vasconcelos D. P. et al. Macrophage polarization following chitosan implantation. *Biomaterials.* – 2013. – Vol. 34, Issue 38. – P. 9952–9959.

56. Moore L. B. and Kyriakides T. R. Molecular characterization of macrophage-biomaterial interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 865. – P. 109–122.
57. Farace C. et al. Immune cell impact of three differently coated lipid nanocapsules: Pluronic, chitosan and polyethylene glycol. *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 6, Issue 1. – P. 1–14.
58. Lei H. et al. Regulatory T cell-mediated anti-inflammatory effects promote successful tissue repair in both indirect and direct manners. *Front. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1–10.
59. Korn T. and Muschaweckh A. Stability and Maintenance of Foxp3+ Treg Cells in Non-lymphoid Microenvironments. *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1–8.
60. Kumar P. et al. Restoring self-tolerance in autoimmune diseases by enhancing regulatory T-cells. *Cell. Immunol.* – 2019. – Vol. 339. – P. 41–49.
61. Bal S. M. and Stadhouders R. Tregs in fibrosis: To know your enemy, you must become your enemy. *Sci. Immunol.* – 2019. – Vol. 4, Issue 39. – P. 6–9.
62. Gu B. K., Park S. J., Kim M. S., Kang C. M., Il Kim J. and Kim C. H. Fabrication of sonicated chitosan nanofiber mat with enlarged porosity for use as hemostatic materials. *Carbohydr. Polym.* – 2013. – Vol. 97, Issue 1. – P. 65–73.
63. Yan T. et al. Biodegradable collagen sponge reinforced with chitosan/calcium pyrophosphate nanoflowers for rapid hemostasis. *Carbohydr. Polym.* – 2017. – Vol. 170. – P. 271–280.
64. Kong M., Chen X. G., Xing K. and Park H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* – 2010. – Vol. 144, Issue 1. – P. 51–63.
65. Kravanja G., Primožič M., Knez Ž. and Leitgeb M. Chitosan-Based (Nano)Materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, Issue 10. – P. 1960.
66. Arkoun M., Daigle F., Heuzey M.-C. and A. Ajji. Mechanism of Action of Electrospun Chitosan-Based Nanofibers against Meat Spoilage and Pathogenic Bacteria. *Molecules.* – 2017. – Vol. 22, Issue 4. – P. 585.

67. Rodríguez K., Sundberg J., Gatenholm P. and Renneckar S. Electrospun nanofibrous cellulose scaffolds with controlled microarchitecture. *Carbohydr. Polym.* – 2014. – Vol. 100. – P. 143–149.
68. Sulaieva O., Deliy V. and Zharikov S. Relationship between leukocytes recruitment and risk of rebleeding in patients with peptic ulcers. *Pathophysiology* – 2015. – Vol. 22, Issue 4. – P. 175–182.
69. Eisinger F. and Langer H. F. The Mutual Relation of Platelet Activation and Innate Immunity. *Hamostaseologie.* –2018. – Vol. 38, Issue 4. –P. 186–202.
70. Eisinger F., Patzelt J. and Langer H. F. The platelet response to tissue injury, *Front. Med.* – 2018. – Vol. 5. – P. 1–15.
71. Vishwakarma A. et al. Engineering Immunomodulatory Biomaterials To Tune the Inflammatory Response. *Trends Biotechnol.* –2016. – Vol. 34, Issue 6. – P. 470–482.
72. CR J. and JM A. Effects of Surface-Coupled Polyethylene Oxide on Human Macrophage Adhesion and Foreign Body Giant Cell Formation in Vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* – 1999. – Vol. 44, Issue 2. – P. 206–16.
73. Moore L. B. and Kyriakides T. R. Immune Responses to Biosurfaces. *Adv. Exp. Med. Biol.* – Vol. 865, Issue 10. – P. 93–108.
74. R. P. Gonçalves, W. H. Ferreira, R. F. Gouvêa, and C. T. Andrade, “Effect of chitosan on the properties of electrospun fibers from mixed poly(Vinyl Alcohol)/Chitosan solutions,” *Mater. Res.*, vol. 20, no. 4, pp. 984–993, 2017, doi: 10.1590/1980-5373-MR-2016-0618.
75. V. Deineka et al., “Hemostatic and Tissue Regeneration Performance of Novel Electrospun Chitosan-Based Materials,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 6, p. 588, 2021, doi: 10.3390/biomedicines9060588.
76. M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D. A. Saldaña-Koppel, and L. F. Quiñones-Olvera, “Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/821279.



77. A. F. De Faria, F. Perreault, E. Shaulsky, L. H. Arias Chavez, and M. Elimelech, "Antimicrobial Electrospun Biopolymer Nanofiber Mats Functionalized with Graphene Oxide-Silver Nanocomposites," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 23, pp. 12751–12759, 2015, doi: 10.1021/acsami.5b01639.
78. R. C. Goy, D. De Britto, and O. B. G. Assis, "A review of the antimicrobial activity of chitosan," *Polimeros*, vol. 19, no. 3, pp. 241–247, 2009, doi: 10.1590/S0104-14282009000300013.
79. M. Hosseinejad and S. M. Jafari, "Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 85, pp. 467–475, 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022.
80. J. Champer, J. Patel, N. Fernando, E. Salehi, V. Wong, and J. Kim, "Chitosan against cutaneous pathogens," *AMB Express*, vol. 3, pp. 1–8, 2013, doi: 10.1186/2191-0855-3-37.
81. V. Sencadas et al., "Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology," *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 2, pp. 1295–1301, 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.09.017.
82. R. Roy, M. Tiwari, G. Donelli, and V. Tiwari, "Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action," *Virulence*, vol. 9, no. 1, pp. 522–554, 2018, doi: 10.1080/21505594.2017.1313372.
83. H. Homayoni, S. A. H. Ravandi, and M. Valizadeh, "Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization," *Carbohydr. Polym.*, vol. 77, no. 3, pp. 656–661, 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.02.008.
84. Y. Huang, S. Onyeri, M. Siewe, A. Moshfeghian, and S. V. Madhally, "In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 26, no. 36, pp. 7616–7627, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.036.
85. S. Jin et al., "Electrospun silver ion-loaded calcium phosphate/ chitosan antibacterial composite fibrous membranes for guided bone regeneration," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 4591–4605, 2018, doi: 10.2147/IJN.S167793.

86. Abebe, G. M. (2020). The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1705814>
87. P. Sangsanoh and P. Supaphol, “Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions,” *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 10, pp. 2710–2714, 2006, doi: 10.1021/bm060286l.
88. J. M. Frick, A. Ambrosi, L. D. Pollo, and I. C. Tessaro, “Influence of Glutaraldehyde Crosslinking and Alkaline Post-treatment on the Properties of Chitosan-Based Films,” *J. Polym. Environ.*, vol. 26, no. 7, pp. 2748–2757, 2018, doi: 10.1007/s10924-017-1166-3.
89. M. Arkoun, F. Daigle, M. C. Heuzey, and A. Ajjji, “Antibacterial electrospun chitosan-based nanofibers: A bacterial membrane perforator,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 5, no. 4, pp. 865–874, 2017, doi: 10.1002/fsn3.468.
90. S. Jin et al., “Electrospun silver ion-loaded calcium phosphate/ chitosan antibacterial composite fibrous membranes for guided bone regeneration,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 4591–4605, 2018, doi: 10.2147/IJN.S167793.
91. J. Lopez-Esparza, L. Francisco Espinosa-Cristobal, A. Donohue-Cornejo, and S. Y. Reyes-Lopez, “Antimicrobial activity of silver nanoparticles in polycaprolactone nanofibers against gram-positive and gram-negative bacteria,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 55, no. 49, pp. 12532–12538, 2016, doi: 10.1021/acs.iecr.6b02300.
92. H. Celebi, M. Gurbuz, S. Koparal, and A. Dogan, “Development of antibacterial electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver ion-incorporated HAP nanoparticles,” *Compos. Interfaces*, vol. 20, no. 9, pp. 799–812, 2013, doi: 10.1080/15685543.2013.819700.
93. Y. Husak et al., “Morphological changes in gram-negative microorganisms treated with silver and copper nanoparticles,” *Springer Proc. Phys.*, vol. 244, pp. 51–57, 2020, doi: 10.1007/978-981-15-3996-1\_5.
94. B. Khalandi et al., “A Review on Potential Role of Silver Nanoparticles and Possible Mechanisms of their Actions on Bacteria,” *Drug Res. (Stuttg.)*, vol. 67, no. 2, pp. 70–76, 2017, doi: 10.1055/s-0042-113383.

95. T. Chatterjee, B. K. Chatterjee, D. Majumdar, and P. Chakrabarti, "Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1850, no. 2, pp. 299–306, 2015, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.10.022.
96. A. Abbaszadegan et al., "The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: A preliminary study," *J. Nanomater.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/720654.
97. E. Z. Gomaa, "Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: A case study on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as models for gram-positive and gram-negative bacteria," *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 63, no. 1, pp. 36–43, 2017, doi: 10.2323/jgam.2016.07.004.
98. W. Lee, K. J. Kim, and D. G. Lee, "A novel mechanism for the antibacterial effect of silver nanoparticles on *Escherichia coli*," *BioMetals*, vol. 27, no. 6, pp. 1191–1201, 2014, doi: 10.1007/s10534-014-9782-z.
99. S. Prabhu and E. K. Poullose, "Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects," *Int. Nano Lett.*, vol. 2, no. 1, 2012, doi: 10.1186/2228-5326-2-32.
100. S. Castiglioni, A. Cazzaniga, L. Locatelli, and J. A. M. Maier, "Silver nanoparticles in orthopedic applications: New insights on their effects on osteogenic cells," *Nanomaterials*, vol. 7, no. 6, 2017, doi: 10.3390/nano7060124.
- 100.O. Oleshko et al., "Ag nanoparticle-decorated oxide coatings formed via plasma electrolytic oxidation on ZrNb alloy," *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 22, 2019, doi: 10.3390/ma12223742.
101. N. Xu et al., "Silver-loaded nanotubular structures enhanced bactericidal efficiency of antibiotics with synergistic effect in vitro and in vivo," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 731–743, 2017, doi: 10.2147/IJN.S123648.
102. N. Kumar et al., "Biocompatible agarose-chitosan coated silver nanoparticle composite for soft tissue engineering applications," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 46, no. 3, pp. 637–649, 2018, doi: 10.1080/21691401.2017.1337021.

103. O. Oleshko et al., “In vitro biological characterization of silver-doped anodic oxide coating on titanium,” *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 19, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3390/ma13194359.
104. Y. Varava, Y. Samokhin, A. Savchenko, K. Diedkova, S. Kyrylenko and V. Korniienko, “Antimicrobial Electrospun Chitosan Nanofibrous Membranes Functionalized with Silver Nanoparticles,” 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP), 2021, pp. 1-4, doi: 10.1109/NAP51885.2021.9568584.
105. Варавя Ю. В. “Функціональні властивості нановолокнистих мембран на основі хітозану, виготовлених методом електропрядіння та модифікованих наночастками срібла,” Всеукраїнський конкурс студентських наукових робіт з галузей знань і спеціальностей у 2020/2021 навчальному році у галузі “Теоретична медицина”. – Одеса, 2021.
106. Y. Qing et al., “Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 3311–3327, 2018, doi: 10.2147/IJN.S165125
107. M. Arkoun, F. Daigle, M. C. Heuzey, and A. Ajji, “Antibacterial electrospun chitosan-based nanofibers: A bacterial membrane perforator,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 5, no. 4, pp. 865–874, 2017, doi: 10.1002/fsn3.468.
108. D. A. Pompa-Monroy et al., “Bacterial biofilm formation using pcl/curcumin electrospun fibers and its potential use for biotechnological applications,” *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 23, pp. 1–22, 2020, doi: 10.3390/ma13235556.
109. V. Pillay et al., “A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications,” *J. Nanomater.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/789289.
110. M. Zienkiewicz-Strzałka, A. Deryło-Marczewska, Y. A. Skorik, V. A. Petrova, A. Choma, and I. Komanięcka, “Silver nanoparticles on chitosan/silica nanofibers: Characterization and antibacterial activity,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 1, 2020, doi: 10.3390/ijms21010166.

111. S. Shinde, L. H. Lee, and T. Chu, "Inhibition of biofilm formation by the synergistic action of EGCG-S and antibiotics," *Antibiotics*, vol. 10, no. 2, pp. 1–21, 2021, doi: 10.3390/antibiotics10020102.
112. M. Arkoun, F. Daigle, M. C. Heuzey, and A. Ajji, "Mechanism of action of electrospun chitosan-based nanofibers against meat spoilage and pathogenic bacteria," *Molecules*, vol. 22, no. 4, 2017, doi: 10.3390/molecules22040585.
113. D. A. Pompa-Monroy et al., "Bacterial biofilm formation using pcl/curcumin electrospun fibers and its potential use for biotechnological applications," *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 23, pp. 1–22, 2020, doi: 10.3390/ma13235556.
114. B. Khalandi et al., "A Review on Potential Role of Silver Nanoparticles and Possible Mechanisms of their Actions on Bacteria," *Drug Res. (Stuttg)*, vol. 67, no. 2, pp. 70–76, 2017, doi: 10.1055/s-0042-113383.
115. M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D. A. Saldaña-Koppel, and L. F. Quiñones-Olvera, "Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/821279.
116. O. Oleshko et al., "In vitro biological characterization of silver-doped anodic oxide coating on titanium," *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 19, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3390/ma13194359.
117. P. Nitti et al., "Influence of nanofiber orientation on morphological and mechanical properties of electrospun chitosan mats," *J. Healthc. Eng.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/3651480.
118. V. Korniienko, Ye. Husak, A. Yanovska, R. Banasiuk, A. Yusupova, A. Savchenko, V. Holubnycha & M. Pogorielov, "Functional and biological characterization of chitosan electrospun nanofibrous membrane nucleated with silver nanoparticles," *Applied Nanoscience*, 2021, <https://doi.org/10.1007/s13204-021-01808-5>
119. I. Laidmäe, K. Ērglis, A. Cēbers, P. A. Janmey, and R. Uibo, "Salmon fibrinogen and chitosan scaffold for tissue engineering: in vitro and in vivo evaluation," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 29, no. 12, 2018, doi: 10.1007/s10856-018-6192-8.

120. Y. Liu, Y. Liu, N. Liao, F. Cui, M. Park, and H. Y. Kim, "Fabrication and durable antibacterial properties of electrospun chitosan nanofibers with silver nanoparticles," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 79, pp. 638–643, 2015, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.058.
121. S. J. Lee et al., "Electrospun chitosan nanofibers with controlled levels of silver nanoparticles. Preparation, characterization and antibacterial activity," *Carbohydr. Polym.*, vol. 111, pp. 530–537, 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.04.026.
122. A. T. Hang, B. Tae, and J. S. Park, "Non-woven mats of poly(vinyl alcohol)/chitosan blends containing silver nanoparticles: Fabrication and characterization," *Carbohydr. Polym.*, vol. 82, no. 2, pp. 472–479, 2010, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.05.016.
123. R. Ramalingam et al., "Poly- $\epsilon$ -caprolactone/gelatin hybrid electrospun composite nanofibrous mats containing ultrasound assisted herbal extract: Antimicrobial and cell proliferation study," *Nanomaterials*, vol. 9, no. 3, 2019, doi: 10.3390/nano9030462.
124. J. An, H. Zhang, J. Zhang, Y. Zhao, and X. Yuan, "Preparation and antibacterial activity of electrospun chitosan/ poly(ethylene oxide) membranes containing silver nanoparticles," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 287, no. 12, pp. 1425–1434, 2009, doi: 10.1007/s00396-009-2108-y.
125. Y. Qing et al., "Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 3311–3327, 2018, doi: 10.2147/IJN.S165125.
126. Wang, W. Kapadia, C. Li, F. Lin, R.F. Pereira, P.L. Granja, B. Sarmiento, W. Cui, *Tissuespecific engineering: 3D bioprinting in regenerative medicine*, *J. Control. Release.* 329 (2021) 237–256. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.11.044>.
127. C. Imashiro, T. Shimizu, *Fundamental Technologies and Recent Advances of Cell-Sheet-Based Tissue Engineering*, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 425. <https://doi.org/10.3390/ijms22010425>.
128. Facts and Myths about Organ Donation, (n.d.). <https://www.americantransplantfoundation.org/about-transplant/facts-and-myths/>.

129. A.Q. Maldonado, P. West-Thielke, K. Joyal, C. Rogers, Advances in personalized medicine and noninvasive diagnostics in solid organ transplantation, *Pharmacotherapy*. 41 (2021) 132–143. <https://doi.org/10.1002/phar.2484>.
130. S.K. Williams, R.K. Birla, Tissue engineering solutions to replace contractile function during pediatric heart surgery, *Tissue Cell*. 67 (2020) 101452. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2020.101452>.
131. M. Farokhi, F. Mottaghitalab, Y. Fatahi, M.R. Saeb, P. Zarrintaj, S.C. Kundu, A. Khademhosseini, Silk fibroin scaffolds for common cartilage injuries: Possibilities for future clinical applications, *Eur. Polym. J.* 115 (2019) 251–267. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.03.035>.
132. P. Zarrintaj, S. Manouchehri, Z. Ahmadi, M.R. Saeb, A.M. Urbanska, D.L. Kaplan, M. Mozafari, Agarose-based biomaterials for tissue engineering, *Carbohydr. Polym.* 187 (2018) 66–84. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.060>.
133. E. Kalantari, S.M. Naghib, M.R. Naimi-Jamal, A. Aliahmadi, N.J. Irvani, M. Mozafari, Nanostructured monticellite for tissue engineering applications - Part I: Microstructural and physicochemical characteristics, *Ceram. Int.* 44 (2018) 12731–12738. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.04.076>.
134. A. Mousavi, S. Vahdat, N. Baheiraei, M. Razavi, M.H. Norahan, H. Baharvand, Multifunctional Conductive Biomaterials as Promising Platforms for Cardiac Tissue Engineering, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 7 (2021) 55–82. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01422>.
135. R. Dong, P.X. Ma, B. Guo, Conductive biomaterials for muscle tissue engineering, *Biomaterials*. 229 (2020) 119584. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119584>.
136. Y. Wu, L. Wang, B. Guo, Y. Shao, P.X. Ma, Electroactive biodegradable polyurethane significantly enhanced Schwann cells myelin gene expression and neurotrophin secretion for peripheral nerve tissue engineering, *Biomaterials*. 87 (2016) 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.010>.
137. M. Cicciù, L. Fiorillo, G. Cervino, M.B. Habal, Bone Morphogenetic Protein Application as Grafting Materials for Bone Regeneration in Craniofacial Surgery:

Current Application and Future Directions, *J. Craniofac. Surg.* 32 (2021) 787–793. <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000006937>.

138. A. Ul Haq, F. Carotenuto, F. De Matteis, P. Proposito, R. Francini, L. Teodori, A. Pasquo, P. Di Nardo, Intrinsically Conductive Polymers for Striated Cardiac Muscle Repair, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 8550. <https://doi.org/10.3390/ijms22168550>.

139. A. Fakhrali, M. Nasari, N. Poursharifi, D. Semnani, H. Salehi, M. Ghane, S. Mohammadi, Biocompatible graphene- embedded PCL/PGS - based nanofibrous scaffolds: A potential application for cardiac tissue regeneration, *J. Appl. Polym. Sci.* 138 (2021) 51177. <https://doi.org/10.1002/app.51177>.

140. J.S. Choi, J.S. Park, B. Kim, B.-T. Lee, J.-H. Yim, In vitro biocompatibility of vapour phase polymerised conductive scaffolds for cell lines, *Polymer (Guildf)*. 124 (2017) 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.07.047>.

141. H. Farkhondehnia, M. Amani Tehran, F. Zamani, Fabrication of Biocompatible PLGA/PCL/PANI Nanofibrous Scaffolds with Electrical Excitability, *Fibers Polym.* 19 (2018) 1813–1819. <https://doi.org/10.1007/s12221-018-8265-1>.

142. T. Blachowicz, A. Ehrmann, Conductive Electrospun Nanofiber Mats, *Materials (Basel)*. 13 (2019) 152. <https://doi.org/10.3390/ma13010152>.

143. X. Zhao, R. Dong, B. Guo, P.X. Ma, Dopamine-Incorporated Dual Bioactive Electroactive Shape Memory Polyurethane Elastomers with Physiological Shape Recovery Temperature, High Stretchability, and Enhanced C2C12 Myogenic Differentiation, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 29595–29611. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b10583>.

144. C. Korupalli, H. Li, N. Nguyen, F. Mi, Y. Chang, Y. Lin, H. Sung, Conductive Materials for Healing Wounds: Their Incorporation in Electroactive Wound Dressings, Characterization, and Perspectives, *Adv. Healthc. Mater.* 10 (2021) 2001384. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001384>.

145. R. Yu, H. Zhang, B. Guo, Conductive Biomaterials as Bioactive Wound Dressing for Wound Healing and Skin Tissue Engineering, *Nano-Micro Lett.* 14 (2022) 1–46. <https://doi.org/10.1007/s40820-021-00751-y>.



146. B. Guo, P.X. Ma, *Conducting Polymers for Tissue Engineering, Biomacromolecules*. 19 (2018) 1764–1782. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00276>.
147. A. Pajor-Świerzy, K. Szczepanowicz, A. Kamyshny, S. Magdassi, Metallic core-shell nanoparticles for conductive coatings and printing, *Adv. Colloid Interface Sci.* 299 (2022) 102578. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102578>.
148. M. Yadid, R. Feiner, T. Dvir, Gold Nanoparticle-Integrated Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Nano Lett.* 19 (2019) 2198–2206. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b00472>.
149. P. Wang, X. Wang, L. Wang, X. Hou, W. Liu, C. Chen, Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16 (2015) 034610. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/3/034610>.
150. Z. Peng, T. Zhao, Y. Zhou, S. Li, J. Li, R.M. Leblanc, Bone Tissue Engineering via Carbon-Based Nanomaterials, *Adv. Healthc. Mater.* 9 (2020) 1901495. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901495>.
151. K. Feron, R. Lim, C. Sherwood, A. Keynes, A. Brichta, P. Dastoor, Organic Bioelectronics: Materials and Biocompatibility, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 2382. <https://doi.org/10.3390/ijms19082382>.
152. R. Guazzo, C. Gardin, G. Bellin, L. Sbricoli, L. Ferroni, F. Ludovichetti, A. Piattelli, I. Antoniac, E. Bressan, B. Zavan, Graphene-Based Nanomaterials for Tissue Engineering in the Dental Field, *Nanomaterials*. 8 (2018) 349. <https://doi.org/10.3390/nano8050349>.
153. M. Naguib, M.W. Barsoum, Y. Gogotsi, Ten Years of Progress in the Synthesis and Development of MXenes, *Adv. Mater.* 33 (2021) 2103393. <https://doi.org/10.1002/adma.202103393>.
154. A.V. Mohammadi, J. Rosen, Y. Gogotsi, The world of two-dimensional carbides and nitrides (MXenes), *Science* (80-. ). 372 (2021). <https://doi.org/10.1126/science.abf1581>.
155. M. Pogorelov, K. Smyrnova, S. Kyrylenko, O. Gogotsi, V. Zahorodna, A. Pogrebnjak, MXenes— A New Class of Two-Dimensional Materials: Structure,

- Properties and Potential Applications, *Nanomaterials*. 11 (2021) 3412. <https://doi.org/10.3390/nano11123412>.
156. G.P. Lim, C.F. Soon, N.L. Ma, M. Morsin, N. Nayan, M.K. Ahmad, K.S. Tee, Cytotoxicity of MXene-based nanomaterials for biomedical applications: A mini review, *Environ. Res.* 201 (2021) 111592. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111592>.
157. M. Jeon, B.-M. Jun, S. Kim, M. Jang, C.M. Park, S.A. Snyder, Y. Yoon, A review on MXenebased nanomaterials as adsorbents in aqueous solution, *Chemosphere*. 261 (2020) 127781. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127781>.
158. H. Riazi, G. Taghizadeh, M. Soroush, MXene-Based Nanocomposite Sensors, *ACS Omega*. 6 (2021) 11103–11112. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05828>.
159. F. Vitale, N. Driscoll, B. Murphy, Biomedical Applications of MXenes, in: *2D Met. Carbides Nitrides*, Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 503–524. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-19026-2\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-030-19026-2_26).
160. N. Driscoll, B. Erickson, B.B. Murphy, A.G. Richardson, G. Robbins, N. V. Apollo, G. Mentzelopoulos, T. Mathis, K. Hantanasirisakul, P. Bagga, S.E. Gullbrand, M. Sergison, R. Reddy, J.A. Wolf, H.I. Chen, T.H. Lucas, T.R. Dillingham, K.A. Davis, Y. Gogotsi, J.D. Medaglia, F. Vitale, MXene-infused bioelectronic interfaces for multiscale electrophysiology and stimulation, *Sci. Transl. Med.* 13 (2021) 14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf8629>.
161. Y. Wang, R. Garg, J.E. Hartung, A. Goad, D.A. Patel, F. Vitale, M.S. Gold, Y. Gogotsi, T. Cohen- Karni, Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> MXene Flakes for Optical Control of Neuronal Electrical Activity, *ACS Nano*. 15 (2021) 14662–14671. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04431>.
162. S. Kyrylenko, V. Kornienko, O. Gogotsi, O. Oleshko, M. Kolesnyk, O. Mishchenko, V. Zahorodna, V. Buranich, A. Pogrebnjak, Y. Zozulia, V. Balitskyi, M. Pogorielov, I. Baginskiy, Bio-functionalization of Electrospun Polymeric Nanofibers by Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> MXene, in: *2020 IEEE 10th Int. Conf. Nanomater. Appl. Prop.*, IEEE, 2020: pp. 02BA10-1-02BA10-5. <https://doi.org/10.1109/NAP51477.2020.9309612>.

163. T.N. Kołtunowicz, P. Gałaszkiwicz, K. Kierczyński, P. Rogalski, P. Okal, A.D. Pogrebnyak, V. Buranich, M. Pogorielov, K. Diedkova, V. Zahorodna, V. Balitskyi, V. Serhiienko, I. Baginskyi, O. Gogotsi, Investigation of AC Electrical Properties of MXene-PCL Nanocomposites for Application in Small and Medium Power Generation, *Energies*. 14 (2021) 7123. <https://doi.org/10.3390/en14217123>.
164. F. Shi, J. Sun, J. Wang, M. Liu, Z. Yan, B. Zhu, Y. Li, X. Cao, MXene versus graphene oxide: Investigation on the effects of 2D nanosheets in mixed matrix membranes for CO<sub>2</sub> separation, *J. Memb. Sci.* 620 (2021) 118850. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2020.118850>.
165. M. Gabriel, A. Anzalone, E. Gratton, L.C. Estrada, A tracking- based nanoimaging method for fast detection of surfaces' inhomogeneities using gold nanoparticles, *Microsc. Res. Tech.* (2019) jemt.23350. <https://doi.org/10.1002/jemt.23350>.
166. K.-C. Huang, J. McCall, P. Wang, C.-S. Liao, G. Eakins, J.-X. Cheng, C. Yang, High-Speed Spectroscopic Transient Absorption Imaging of Defects in Graphene, *Nano Lett.* 18 (2018) 1489– 1497. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b05283>.
167. A. Giacomello, L. Schimmele, S. Dietrich, Wetting hysteresis induced by nanodefects, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016). <https://doi.org/10.1073/pnas.1513942113>.
168. R.W. Siegel, Positron Annihilation Spectroscopy, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 10 (1980) 393–425. <https://doi.org/10.1146/annurev.ms.10.080180.002141>.
169. Y.C. Jean, J.D. Van Horn, W.-S. Hung, K.-R. Lee, Perspective of Positron Annihilation Spectroscopy in Polymers, *Macromolecules*. 46 (2013) 7133–7145. <https://doi.org/10.1021/ma401309x>.
170. J.J. Pireaux, High resolution XPS of organic polymers: the scienta ESCA300 database, *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*. 62 (1993) 371–372. [https://doi.org/10.1016/0368-2048\(93\)85006-7](https://doi.org/10.1016/0368-2048(93)85006-7).
171. V. Natu, M. Benchakar, C. Canaff, A. Habrioux, S. Célérier, M.W. Barsoum, A critical analysis of the X-ray photoelectron spectra of Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>z</sub> MXenes, *Matter*. 4 (2021) 1224–1251. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2021.01.015>.

172. W.Y. Chen, X. Jiang, S.-N. Lai, D. Peroulis, L. Stanciu, Nanohybrids of a MXene and transition metal dichalcogenide for selective detection of volatile organic compounds, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1302. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15092-4>.
173. A. Pogrebnyak, V. Ivashchenko, O. Maksakova, V. Buranich, P. Konarski, V. Bondariev, P. Zukowski, P. Skrynskyy, A. Sinelnichenko, I. Shelest, N. Erdybaeva, P. Galaszkiwicz, T.N. Koltunowicz, Comparative measurements and analysis of the mechanical and electrical properties of Ti-Zr-C nanocomposite: Role of stoichiometry, *Measurement*. 176 (2021) 109223. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2021.109223>.
174. T.N. Koltunowicz, P. Zukowski, O. Boiko, K. Czarnacka, V. Bondariev, A. Saad, A. V. Larkin, A.K. Fedotov, Capacitive properties of nanocomposite  $(\text{FeCoZr})_x(\text{PZT})(100-x)$  produced by sputtering with the use of argon and oxygen ions beam, *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* 27 (2016) 1171–1176. <https://doi.org/10.1007/s10854-015-3868-4>.
175. I.A. Svito, A.K. Fedotov, A. Saad, P. Zukowski, T.N. Koltunowicz, Influence of oxide matrix on electron transport in  $(\text{FeCoZr})_x(\text{Al}_2\text{O}_3)_{1-x}$  nanocomposite films, *J. Alloys Compd.* 699 (2017) 818–823. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.01.043>.
176. J. Johansson, K. Cedergren, T. Bauch, F. Lombardi, Properties of inductance and magnetic penetration depth in (103)-oriented  $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-\delta}$  thin films, *Phys. Rev. B.* 79 (2009) 214513. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.79.214513>.
177. S. Miki, M. Takeda, M. Fujiwara, M. Sasaki, A. Otomo, Z. Wang, Superconducting NbTiN Nanowire Single Photon Detectors with Low Kinetic Inductance, *Appl. Phys. Express.* 2 (2009) 075002. <https://doi.org/10.1143/APEX.2.075002>.
178. H. Cai, H. Li, E.Y. Cho, S.A. Cybart, Inductance of  $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-\delta}$  Thin-Films With and Without Superconducting Ground Planes, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* 30 (2020) 1–5. <https://doi.org/10.1109/TASC.2020.2999390>.
179. A. Alizadeh Sahraei, M. Ayati, M. Baniassadi, D. Rodrigue, M. Baghani, Y. Abdi, AC and DC electrical behavior of MWCNT/epoxy nanocomposite near

percolation threshold: Equivalent circuits and percolation limits, *J. Appl. Phys.* 123 (2018) 105109. <https://doi.org/10.1063/1.5019347>.

180. T.N. Koltunowicz, P. Zukowski, V. Bondariev, A.K. Fedotov, I. Svito, J. Fedotova, A. Saad, Voltage and Current Resonance in Nanocomposite  $(\text{FeCoZr})_x(\text{CaF}_2)_{100-x}$  Produced by Ion-Beam Sputtering in Pure Argon Atmosphere, *Acta Phys. Pol. A.* 128 (2015) 897–901. <https://doi.org/10.12693/APhysPolA.128.897>.

181. T.N. Kołtunowicz, V. Bondariev, P. Żukowski, J.A. Fedotova, A.K. Fedotov, AC electrical resonances in nanocomposites with partly oxidized FeCoZr grains embedded in CaF<sub>2</sub> ceramic matrix – effects of annealing, *J. Alloys Compd.* 819 (2020) 153361. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.153361>.

182. W. Zhang, X.-X. Fang, Q.-C. Li, W. Pi, N. Han, Reduced graphene oxide-embedded nerve conduits loaded with bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote peripheral nerve regeneration, *Neural Regen. Res.* 18 (2023) 200. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.343889>.

183. R. Borah, J.M. Das, J. Upadhyay, Surface Functionalized Polyaniline Nanofibers:Chitosan Nanocomposite for Promoting Neuronal-like Differentiation of Primary Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells and Urease Activity, *ACS Appl. Bio Mater.* 5 (2022) 3193–3211. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00171>.

184. Y. Ma, H. Gao, H. Wang, X. Cao, Engineering topography: effects on nerve cell behaviors and applications in peripheral nerve repair, *J. Mater. Chem. B.* 9 (2021) 6310–6325. <https://doi.org/10.1039/D1TB00782C>.

185. M. Seredych, C.E. Shuck, D. Pinto, M. Alhabeb, E. Precetti, G. Deysner, B. Anasori, N. Kurra, Y. Gogotsi, High-Temperature Behavior and Surface Chemistry of Carbide MXenes Studied by Thermal Analysis, *Chem. Mater.* 31 (2019) 3324–3332. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b00397>.

186. J. Kansy, Microcomputer program for analysis of positron annihilation lifetime spectra, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* 374 (1996) 235–244. [https://doi.org/10.1016/0168-9002\(96\)00075-7](https://doi.org/10.1016/0168-9002(96)00075-7).

187. M. Hasegawa, T. Chiba, A. Kawasuso, T. Akahane, M. Suezawa, S. Yamaguchi, K. Sumino, Positron-Annihilation 2D-Acar Study of Divacancy and Vacancy-Oxygen

Pairs in Si, Mater. Sci. Forum. 196–201 (1995) 1481–1490.  
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.196-201.1481>.

188. J. Kuriplach, A.L. Morales, C. Dauwe, D. Segers, M. Šob, Vacancies and vacancy-oxygen complexes in silicon: Positron annihilation with core electrons, Phys. Rev. B. 58 (1998) 10475–10483. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.58.10475>.

189. A. Pogrebnjak, O. Bakharev, N. Pogrebnjak Jr, Y. Tsvintarnaya, V. Shablja, R. Sandrik, A. Zecca, Certain features of high-dose and intensive implantation of Al ions in iron, Phys. Lett. A. 265 (2000) 225–232. [https://doi.org/10.1016/S0375-9601\(99\)00838-5](https://doi.org/10.1016/S0375-9601(99)00838-5).

190. M.A. Trauwaert, J. Vanhellefont, H.E. Maes, A.M. Van Bavel, G. Langouche, P. Clauws, Lowtemperature anneal of the divacancy in p -type silicon: A transformation from V<sub>2</sub> to V<sub>x</sub>O<sub>y</sub> complexes?, Appl. Phys. Lett. 66 (1995) 3056–3057. <https://doi.org/10.1063/1.114276>.

191. A.D. Pogrebnjak, A.A. Bagdasaryan, P. Horodek, V. Tarelnyk, V.V. Buranich, H. Amekura, N. Okubo, N. Ishikawa, V.M. Beresnev, Positron annihilation studies of defect structure of (TiZrHfNbV)N nitride coatings under Xe<sup>14+</sup> 200 MeV ion irradiation, Mater. Lett. 303 (2021) 130548. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.130548>.

192. A. Pogrebnjak, V. Buranich, V. Ivashchenko, L. Baimoldanova, K. Rokosz, S. Raaen, P. Zukowski, M. Opielak, B. Rakhadilov, V. Beresnev, N. Erdybaeva, The Effect of Substrate Treatment on the Properties of TiAlSiYN/CrN Nanocomposite Coatings, Surfaces and Interfaces. 30 (2022) 101902. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2022.101902>.

193. D. Gupta, A.K. Singh, N. Kar, A. Dravid, J. Bellare, Modelling and optimization of NaOH-etched 3-D printed PCL for enhanced cellular attachment and growth with minimal loss of mechanical strength, Mater. Sci. Eng. C. 98 (2019) 602–611. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.084>.

194. S.J. Cho, S.M. Jung, M. Kang, H.S. Shin, J.H. Youk, Preparation of hydrophilic PCL nanofiber scaffolds via electrospinning of PCL/PVP-b-PCL block copolymers for

enhanced cell biocompatibility, *Polymer (Guildf)*. 69 (2015) 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.05.037>.

195. H. Hirata, M. Sokabe, C.T. Lim, Molecular Mechanisms Underlying the Force-Dependent Regulation of Actin-to-ECM Linkage at the Focal Adhesions, in: 2014: pp. 135–154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394624-9.00006-3>

196. W.L. Lim, S.R. Chowdhury, M.H. Ng, J.X. Law, Physicochemical Properties and Biocompatibility of Electrospun Polycaprolactone/Gelatin Nanofibers, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 18 (2021) 4764. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094764>

197. U. Arif, S. Haider, A. Haider, N. Khan, A.A. Alghyamah, N. Jamila, M.I. Khan, W.A. Almasry, I.- K. Kang, Biocompatible Polymers and their Potential Biomedical Applications: A Review, *Curr. Pharm. Des.* 25 (2019) 3608–3619. <https://doi.org/10.2174/1381612825999191011105148>.

198. V. Korniienko, Y. Husak, A. Yanovska, R. Banasiuk, A. Yusupova, A. Savchenko, V. Holubnycha, M. Pogorielov, Functional and biological characterization of chitosan electrospun nanofibrous membrane nucleated with silver nanoparticles, *Appl. Nanosci.* 12 (2022) 1061–1070. <https://doi.org/10.1007/s13204-021-01808-5>.

199. S. Abdulghani, G. Mitchell, Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review, *Biomolecules*. 9 (2019) 750. <https://doi.org/10.3390/biom9110750>

200. S. Kyrylenko, O. Gogotsi, I. Baginskiy, V. Balitskyi, V. Zahorodna, Y. Husak, I. Yanko, M. Pernakov, A. Roshchupkin, M. Lyndin, B.B. Singer, V. Buranych, A. Pogrebnyak, O. Sulaieva, O. Solodovnyk, Y. Gogotsi, M. Pogorielov, MXene-Assisted Ablation of Cells with a Pulsed Near- Infrared Laser, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 14 (2022) 28683–28696. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c08678>.

201. H. Riazi, G. Taghizadeh, M. Soroush, MXene-Based Nanocomposite Sensors, *ACS Omega*. 6 (2021) 11103–11112. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05828>

202. M.A. Pfaller, D.J. Sheehan, J.H. Rex, Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization, *Clin. Microbiol. Rev.* 17 (2004) 268–280. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.268-280.2004>.

203. K. Rasool, K.A. Mahmoud, D.J. Johnson, M. Helal, G.R. Berdiyrov, Y. Gogotsi, Efficient Antibacterial Membrane based on Two-Dimensional Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> (MXene) Nanosheets, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1598. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01714-3>.
204. M. Pogorielov, A. Hapchenko, V. Deineka, L. Rogulska, O. Oleshko, K. Vodsed'álková, L. Berezkinová, L. Vysloužilová, A. Klápšř'ová, J. Erben, In vitro degradation and in vivo toxicity of NanoMatrix3D® polycaprolactone and poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 106 (2018) 2200–2212. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36427>.
205. M. Alhabeb, K. Maleski, B. Anasori, P. Lelyukh, L. Clark, S. Sin, Y. Gogotsi, Guidelines for Synthesis and Processing of Two-Dimensional Titanium Carbide (Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> MXene), *Chem. Mater.* 29 (2017) 7633–7644. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b02847>.
206. L. Gao, C. Li, W. Huang, S. Mei, H. Lin, Q. Ou, Y. Zhang, J. Guo, F. Zhang, S. Xu, H. Zhang, MXene/Polymer Membranes: Synthesis, Properties, and Emerging Applications, *Chem. Mater.* 32 (2020) 1703–1747. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b04408>.
207. M. Aliabadi, W. Konrad, T. Stegmaier, V. Arnim, C. Kaya, Y. Liu, B. Zhan, G. Wang, G. Gresser, A novel method for measuring dynamic contact angles of fibers with spindle-knots, *J. Appl. Polym. Sci.* 138 (2021). <https://doi.org/10.1002/app.50673>.
208. T.N. Koltunowicz, Test Station for Frequency-Domain Dielectric Spectroscopy of Nanocomposites and Semiconductors, *J. Appl. Spectrosc.* 82 (2015) 653–658. <https://doi.org/10.1007/s10812-015-0158-0>.
209. A. Waygood, *An Introduction to Electrical Science*, 2nd ed., Routledge, New York, 2019.
210. D. Halliday, R. Resnick, *Physics, Part 2*, John Wiley & Sons Inc, 1978.
211. T.F. Bahamondez-Canas, L.A. Heersema, H.D.C. Smyth, Current Status of In Vitro Models and Assays for Susceptibility Testing for Wound Biofilm Infections, *Biomedicines.* 7 (2019) 34. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7020034>.