

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

Самохін Євген Олександрович

УДК 614:616-085.281.9:579.8:620.3-022.532(043.5)

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ОЦІНКА БІОСУМІСНОСТІ ТА АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ**  
**ЕФЕКТИВНОСТІ ТРИВИМІРНИХ ВОЛОКНИСТИХ МАТЕРІАЛІВ**  
**З ІНКОРПОРОВАНИМИ НАНОЧАСТИНКАМИ**

222 – Медицина

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

\_\_\_\_\_ Є. О. Самохін

Науковий керівник – **Корнієнко Вікторія Володимирівна**, канд. мед. наук,  
доцент

Суми – 2024

## АНОТАЦІЯ

*Самохін Є. О.* Оцінка біосумісності та антибактеріальної ефективності тривимірних волокнистих матеріалів з інкорпорованими наночастинками – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина». – Сумський державний університет МОН України, Суми, 2024.

Сумський державний університет, Суми, 2024.

Дисертація присвячена дослідженню біосумісності та антибактеріальної ефективності тривимірних нановолокон з інкорпорованими наночастинками металів.

Стійкість до антибіотиків є однією з основних проблем в охороні здоров'я та причиною персистувальних інфекцій, пов'язаних з утворенням біоплівки на місцях інфекцій, із медичними пристроями (катетери, протези суглобів і протезні клапани серця), що призводить до зростання необхідності в більш ефективних антибіотиках. Більше того, нові антибіотики демонструють обмежену ефективність проти резистентних штамів. Наприклад, згідно з базою даних ВООЗ з епідеміологічного надзору за стійкістю до антимікробних препаратів за один рік (з 2018 р. до 2019 р.) частота виявлення резистентної до карбапенемів E. coli зросла в Україні з 1 % до 10–25 %.

Серед особливо важливих стратегій боротьби із цією глобальною медико-соціальною проблемою провідним клінічним аспектом є не лише оптимізація використання антибіотиків, а й створення нових рішень із використанням альтернативних протимікробних засобів. Розв'язанню зазначеної актуальної медико-соціальної проблеми сьогодення може сприяти більш широке використання можливостей використання матеріалів із хітозану.

Мета дослідження полягає у розробленні нових антимікробних матеріалів місцевого призначення, що можуть проявити себе як ефективні засоби в боротьбі з бактеріальними інфекціями й сприяти покращанню якості та безпеки життя людей.

Хітозан – це біополімер із відновлюваних ресурсів, який отримують із крабів, омарів, черепах, креветок та комах. Хітозан є особливим типом біополімеру, а наявність первинних амінів у його основній структурі надає йому вигідних фізико-хімічних характеристик та сприяє унікальній взаємодії з білками, клітинами та іншими біологічно активними речовинами. Найважливішими з його властивостей для біомедичного застосування є нетоксичність, антибактеріальна активність та здатність до біодеградації.

Нещодавно електроспінінг став одним із найпопулярніших методів виробництва нановолокон із різних синтетичних і природних полімерів. Цей метод дозволяє отримувати матеріали з діаметрами волокон менше ніж 100 нм, що імітують природний позаклітинний матрикс і можуть сприяти адгезії клітин та регенерації тканин. Також доведено, що волокнисті конструкції з хітозану демонструють більшу ефективність, ніж плівки, губки або гелі.

Хоча численні дослідження вивчали вплив різних параметрів електроспінінгу на структуру нановолокнистих матеріалів, багато з них зосереджені виключно на фізичних характеристиках без урахування їх біологічних властивостей. Вплив параметрів полімерного розчину (таких як молекулярна маса й концентрація полімеру) та умов процесу (швидкість потоку, відстань між колектором і кінчиком голки, прикладена напруга, температура і вологість) на розмір і морфологію нановолокон є загальновизнаним. Однак не менш важливо оцінити вплив цих параметрів процесу на морфологію поверхні, механічні властивості, розмір та кількість пор нановолоконних мембран, оскільки вони є важливими показниками якості матеріалу.

Обмеження, пов'язані з електропряденими матеріалами, включають низькі антимікробні властивості, слабкі механічні характеристики, низьку біодеградацію та біосумісність, можуть бути усунені шляхом змішування білків, полісахаридів та синтетичних полімерів.

Проте електропрядіння розчину хітозану є досить складним процесом через його високу в'язкість та наявність вільних аміногруп, які утворюють позитивно заряджений поліелектроліт у кислому середовищі. Збільшення

концентрації кислоти в розчині хітозану може знизити поверхневий натяг та полегшити процес електроспінінгу.

Багато органічних і неорганічних кислот використовують для розчинення хітозану. Крім того, тип використаного розчинника також впливає на біологічну активність матеріалів із хітозану. Щодо цього дихлорметан (DCM) та трифтороцтова кислота (TFA) виявилися найбільш придатними розчинниками для виробництва електропрядених волокон хітозану. Розчинники трифтороцтова кислота (TFA) і дихлорметан (DCM) можуть покращити однорідність електропрядених волокон хітозану, оскільки аміногрупи хітозану можуть утворювати солі з TFA, що руйнує взаємодію між молекулами хітозану, сприяючи процесу електропрядіння. Проте мембрани з хітозану, виготовлені з використанням TFA з DCM або без нього, обмежені через втрату волокнистої структури або повне розчинення мембрани після прямого контакту з нейтральними або слаболужними водними розчинами. Було запропоновано різні методи нейтралізації для збереження міцності хітозанових мембран і перетворення їх на нерозчинні у водних середовищах.

Метою першого етапу досліджень було вибрати розчин для виробництва нановолоконних нерозчинних мембран із хітозану, що підходять для біомедичного застосування та інженерії тканин, для подальшої їх модифікації наночастинками металів.

Нові мембрани хітозану, одержані з двох співвідношень співрозчинників TFA/DCM (7:3 і 9:1), були виготовлені за допомогою традиційного електропрядіння, за яким відбувалося оброблення водним 1 М NaOH, водним 1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH-етанолом або Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-етанолом. Мембрани хітозану, виготовлені із співвідношенням 7:3 TFA/DCM, проявили значно вищу пористість із більш однорідним розподілом розмірів волокон порівняно з мембранами хітозану, виготовленими з 9:1 TFA/DCM. Нановолокнисті мембрани, нейтралізовані у водному Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, не зберегли нановолокнистої структури, утворивши плівкову структуру. На відміну від цього постоброблення NaOH-етанолом (70/30) зберегло нановолокнисту структуру. Нейтралізація

етанолом- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  не зберігала нановолокнистої структури, і лише водний  $\text{NaOH}$  зберігав часткову волокнисту структуру зразків. Крім структурної стабільності, нейтралізація  $\text{NaOH}$ -етанолом зберегла структуру мембран після експерименту з деградації у PBS упродовж 1 місяця. Всі варіанти мембран (після виготовлення та після нейтралізації) підтримували прикріплення й проліферацію клітин протягом 6-денного періоду, але оброблення етанолом мембран хітозану, виготовлених із 9:1 TFA/DCM, спричинило зменшення росту клітин. Мембрани хітозану, виготовлені із співвідношення розчинників 7:3 TFA/DCM, проявляли біосумісність та ефективні антибактеріальні властивості проти *S. aureus* і *E. coli*. Проте мембрани хітозану, виготовлені за допомогою системи розчинників 9:1 TFA/DCM та нейтралізовані в спиртовому розчині  $\text{NaOH}$ , проявили більш виражений антиадгезивний потенціал, що дозволяє стверджувати про їх здатність запобігати процесу біоплівкоутворення.

Ці дослідження спонукали до подальших досліджень із використання електропрядених нановолокнистих матеріалів як антибактеріальних засобів для контролю адгезії та проліферації бактерій за допомогою структурних та фізико-хімічних характеристик мембран, а також виробництва нановолокнистих нерозчинних мембран із хітозану, придатних для біомедичних застосувань та інженерії тканин.

Значною перевагою інженерії електропрядених нановолокон є можливість виготовлення композитних полімерних волокон із різними властивостями за допомогою включення різних лікарських засобів для надання їм необхідних терапевтичних властивостей. Поліетиленгліколь (PEG)- нановолокна можуть бути завантажені різними речовинами, включаючи наночастинки, рослинні екстракти, вуглецеві наноматеріали та антимікробні агенти з метою посилення антимікробних властивостей. Крім того, важливим напрямком досліджень є контрольоване вивільнення терапевтичних агентів з електропрядених нановолокон. Особливо перспективним є використання електропрядених нановолокон у ранових пов'язках. Велика площа поверхні нановолокон дозволяє покращити загоєння ран. Розроблення пористих мембран на основі хітозану та

полімолочної кислоти було реалізоване як потенційне рішення.

Результати показують, що додавання PEG до полімерних розчинів істотно впливає на діаметр, морфологію та пористість електропрядених нановолокон. Додавання PEG до розчину із суміші хітозан / полімолочна кислота (Ch/PLA) підвищує гідрофільність отриманих матеріалів. Виготовлені матеріали, що складаються з Ch, модифікованого PLA і PEG як співрозчинника, разом із постобробленням (нейтралізацією лугом) для підвищення водостійкості демонструють повільнішу швидкість деградації (стабільна помірنا втрата ваги впродовж 16 тижнів) і знижену гідрофобність (менший контактний кут, що досягає  $21,95 \pm 2,17^\circ$ ), що робить їх перспективними для біомедичних застосувань. Антибактеріальну активність мембран оцінювали стосовно золотистого стафілокока та кишкової палички, причому зразки, що містять PEG, показали вдвічі більші рівні пригнічення швидкості розмноження бактерій. Дослідження в культурі клітин *in vitro* продемонстрували, що PEG-вмісні матеріали сприяють рівномірному прикріпленню та проліферації клітин.

Адгезія бактерій – це складний процес, що має багато стадій і призводить до формування біоплівки. Різноманітні фізичні сили та фізико-хімічні взаємодії спочатку призводять до реверсивної, а пізніше – до необоротної мікробної адгезії. Формуванню мікробної біоплівки можна запобігти за допомогою прямого контактного антимікробного ефекту. Посилені антимікробні властивості можна досягти за допомогою включення біоцидних агентів, таких як металеві наночастинки, до біополімеру. Проте електропрядені нановолокна, навантажені металевими наночастинками, такими як AgNPs, можуть мати цитотоксичний ефект на клітини ссавців. З іншого боку, успішне керування складом розчину та контрольованою структурою нановолокнистих мембран на додаток до відповідної процедури постоброблення є необхідним, урахувавши важливість початкової взаємодії між бактеріальними клітинами й нановолокнами.

Антимікробні властивості срібла та його іонів мають великий потенціал у дослідженнях, спрямованих на створення полімерних матеріалів, що містять

інкорпоровані срібні наночастинки (AgNPs), які зможуть забезпечити вивільнення AgNPs й тривалий антибактеріальний ефект. Розміри частинок AgNPs перебувають у діапазоні 1–100 нм, що характеризує їх як наноматеріали. Вони демонструють підвищену здатність та більшу площу поверхні до об'єму порівняно зі звичайним сріблом. На нанорівні AgNPs проявляють унікальні електричні, оптичні та каталітичні властивості й мають антибактеріальну активність проти різних інфекційних і патогенних мікроорганізмів, включаючи стійкі до багатьох антибактеріальних препаратів. Це дослідження висвітлює потенціал електропрядених хітозанових мембран як ефективних антимікробних покриттів для біомедичних застосувань, а інтеграція наночастинок срібла в ці мембрани також підвищує й урівноважує їх дозозалежну антибактеріальну ефективність, починаючи з 25–50 мкг/мл, проти *S. aureus* і *E. coli* в експерименті *in vitro*. Антиадгезивна активність мембран проти цих бактеріальних штамів ще більше підкреслює їх ефективність у боротьбі з мікробними інфекціями, а також у запобіганні утворенню бактеріальних біоплівки завдяки модифікації нановолокнистих матеріалів AgNPs.

Експеримент *in vivo* на лабораторних щурах дозволив установити перевагу навантажених наночастинками срібла Ch/PLA мембран щодо антимікробної дії на ранову інфекцію, сприяючи більш ефективному очищенню та загоєнню ран порівняно з немодифікованими зразками. Мембрани Ch/PLA, модифіковані AgNPs, на 3-тю добу показали помірно виражений запальний процес із некротизованими тканинами та грануляційною тканиною. На 10-ту добу спостерігалось утворення зрілої грануляційної тканини з мінімальною запальною інфільтрацією, а на 21-шу добу тканини характеризувалися фіброзними змінами з незначною запальною реакцією, що свідчило про ефективне загоєння ран.

Комплексне оцінювання цих нових матеріалів, що демонструють покращені фізичні, хімічні й біологічні властивості *in vitro* та *in vivo*, підкреслює їх потенціал для біомедичного застосування в тканинній інженерії та регенеративній медицині.

**Ключові слова:** хітозан, полімолочна кислота, електропрядіння, наноконплекси, цитотоксичність, біосумісність, наночастинки срібла, антибактеріальна активність, гнійна рана, ранові покриття.

## SUMMARY

*Samokhin Ye. O.* Evaluation of Biocompatibility and Antibacterial Efficiency of Three-Dimensional Fibrous Materials with Incorporated Nanoparticles. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 – "Medicine". – Educational and Scientific Medical Institute, Sumy State University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Sumy, 2024.

The dissertation is devoted to the study of the biocompatibility and antibacterial efficiency of three-dimensional nanofibers with incorporated metal nanoparticles.

Antibiotic resistance is one of the major problems in healthcare and is the cause of persistent infections associated with biofilm formation at infection sites related to medical devices (catheters, joint prostheses, and prosthetic heart valves). The need for more effective antibiotics is growing daily. Moreover, new antibiotics show limited effectiveness against resistant strains. For instance, according to the WHO's antimicrobial resistance surveillance database, the detection frequency of carbapenem-resistant *E. coli* in Ukraine increased from 1 % to 10–25 % within one year .

Among the particularly important strategies to combat this global medical and social issue, a leading clinical aspect is not only optimizing the use of antibiotics but also creating new solutions using alternative antimicrobial agents. Addressing this pressing medical and social problem can be facilitated by the broader utilization of materials derived from chitosan.

The aim of the study is to develop new antimicrobial materials that can prove to be effective means in the fight against bacterial infections and contribute to improving the quality and safety of human life.

Chitosan is a biopolymer derived from renewable resources, obtained from crabs, lobsters, turtles, shrimp, insects, and food waste. Chitosan is a special type of



biopolymer, and the presence of primary amines in its main structure gives it advantageous physicochemical characteristics and unique interactions with proteins, cells, and other biologically active substances. The most important properties for biomedical applications are its non-toxicity, antibacterial activity, and biodegradability.

Recently, electrospinning has become one of the most popular methods for producing nanofibers from various synthetic and natural polymers. This method allows for the creation of materials with fiber diameters of less than 100 nm, which mimic the natural extracellular matrix and can promote cell adhesion and tissue regeneration. It has also been proven that fibrous structures made from chitosan demonstrate greater effectiveness than films, sponges, or gels.

Although numerous studies have examined the influence of various electrospinning parameters on the structure of nanofibrous materials, many of them focus exclusively on physical characteristics without considering their biological properties. The impact of polymer solution parameters (such as molecular weight and polymer concentration) and process conditions (flow rate, distance between the collector and the needle tip, applied voltage, temperature, and humidity) on the size and morphology of nanofibers is well recognized. However, it is equally important to assess the influence of these process parameters on surface morphology, mechanical properties, and the size and number of pores in nanofibrous membranes, as these are critical indicators of their quality.

Limitations associated with electrospun materials, such as low antimicrobial properties, weak mechanical characteristics, low biodegradability, and biocompatibility, can be overcome by blending proteins, polysaccharides, and synthetic polymers.

However, electrospinning chitosan solution is quite a complex process due to its high viscosity and the presence of free amino groups, which form a positively charged polyelectrolyte in an acidic environment. Increasing the acid concentration in the chitosan solution can reduce surface tension and facilitate the electrospinning process.

Many organic and inorganic acids are used to dissolve chitosan. Moreover, the

type of solvent used also affects the biological activity of chitosan-based materials. In this regard, dichloromethane (DCM) and trifluoroacetic acid (TFA) have proven to be the most suitable solvents for producing electrospun chitosan fibers. The solvents trifluoroacetic acid (TFA) and dichloromethane (DCM) can improve the uniformity of electrospun chitosan fibers, as chitosan amino groups can form salts with TFA, disrupting interactions between chitosan molecules and promoting the electrospinning process. However, chitosan membranes made using TFA with or without DCM are limited due to the loss of the fibrous structure or complete dissolution of the membrane after direct contact with neutral or slightly alkaline aqueous solutions. Various neutralization methods have been proposed to preserve the strength of chitosan membranes and make them insoluble in aqueous environments.

The aim of the first stage of the research was to select a solution for producing nanofibrous insoluble membranes from chitosan suitable for biomedical applications and tissue engineering, for subsequent modification with metal nanoparticles.

New chitosan membranes, made using two TFA/DCM ratios (7:3 and 9:1), were produced by traditional electrospinning followed by treatment with aqueous 1 M NaOH, aqueous 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaOH-ethanol, or  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -ethanol. Chitosan membranes made with 7:3 TFA/DCM exhibited significantly higher porosity with a more uniform fiber size distribution compared to chitosan membranes made with 9:1 TFA/DCM. Nanofibrous membranes neutralized in aqueous  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  did not retain the nanofibrous structure, forming a film-like structure. In contrast, post-treatment with NaOH-ethanol (70/30) preserved the nanofibrous structure. Neutralization with ethanol- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  did not retain the nanofibrous structure, and only aqueous NaOH preserved a partial fibrous structure. Besides structural stability, NaOH-ethanol neutralization preserved the membrane structure after a degradation experiment in PBS over one month. All membrane variants (post-production and post-neutralization) supported cell attachment and proliferation over a 6-day period, but ethanol treatment of chitosan membranes made with 9:1 TFA/DCM resulted in reduced cell growth. Chitosan membranes made with 7:3 TFA/DCM demonstrated biocompatibility along with moderate and more effective antibacterial properties against *S. aureus* and *E. coli*.

Overall, chitosan membranes made using 7:3 TFA/DCM and then neutralized in a 70 % ethanol / 30 % aqueous solution have potential for biomedical applications in regenerative medicine and as scaffolds for tissue engineering.

These findings encourage further research into the use of electrospun nanofibrous materials as antibacterial agents for controlling bacterial adhesion and proliferation through the structural and physicochemical characteristics of the membranes, as well as the production of nanofibrous insoluble chitosan membranes suitable for biomedical applications and tissue engineering.

A significant advantage of electrospun nanofiber engineering is the ability to create composite polymer fibers with varying properties by incorporating different drugs to provide them with necessary therapeutic properties. PEG nanofibers can be loaded with various substances, including nanoparticles, plant extracts, carbon nanomaterials, and antimicrobial agents, to enhance their antimicrobial properties. Furthermore, controlled release of therapeutic agents from electrospun nanofibers is an important research direction. The use of electrospun nanofibers in wound dressings is particularly promising. The large surface area of nanofibers improves wound healing. The development of porous scaffolds based on chitosan and polylactic acid has been realized as a potential solution.

The results show that the addition of polyethylene glycol (PEG) to polymer solutions significantly affects the diameter, morphology, and porosity of electrospun nanofibers. Adding PEG to the chitosan/polylactic acid (Ch/PLA) solution increases the hydrophilicity of the resulting materials. The produced materials, consisting of Ch, modified PLA, and PEG as a co-solvent, along with post-treatment (alkaline neutralization) to enhance water resistance, exhibit slower degradation rates (stable moderate weight loss over 16 weeks) and reduced hydrophobicity (lower contact angle reaching  $21.95 \pm 2.17^\circ$ ), making them promising for biomedical applications. The antibacterial activity of the membranes was evaluated against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, with PEG-containing samples showing twice the levels of bacterial growth inhibition. In vitro cell culture studies demonstrated that PEG-containing materials promote uniform cell attachment and proliferation.

Bacterial adhesion is a complex, multi-stage process that leads to biofilm formation. Various physical forces and physicochemical interactions initially result in reversible, and later irreversible, microbial adhesion. The formation of microbial biofilms can be prevented through a direct contact antimicrobial effect. Enhanced antimicrobial properties can be achieved by incorporating biocidal agents, such as metal nanoparticles, into the biopolymer. However, electrospun nanofibers loaded with metal nanoparticles, such as AgNPs, may have a cytotoxic effect on mammalian cells. On the other hand, successful management of the solution composition and controlled structure of nanofibrous membranes, in addition to an appropriate post-treatment procedure, is essential considering the importance of the initial interaction between bacterial cells and nanofibers.

The antimicrobial properties of silver and its ions have great potential in research aimed at creating polymeric materials containing incorporated silver nanoparticles (AgNPs) that can provide the release of AgNPs and ensure a prolonged antibacterial effect. The particle sizes of AgNPs range from 1 to 100 nm, which characterizes them as nanomaterials. They exhibit enhanced capability and a larger surface area to volume ratio compared to regular silver. At the nanoscale, AgNPs display unique electrical, optical, and catalytic properties and possess antibacterial activity against various infectious and pathogenic microorganisms, including those resistant to many antibacterial agents. This study highlights the significant potential of electrospun chitosan membranes as effective antimicrobial coatings for biomedical applications, and the integration of silver nanoparticles into these membranes further enhances and balances their dose-dependent antibacterial efficacy, starting from 25–50  $\mu\text{g/mL}$  against *S. aureus* and *E. coli*. The anti-adhesive activity of the membranes against these bacterial strains further emphasizes their effectiveness in combating microbial infections and preventing bacterial biofilm formation through the modification of nanofibrous materials with AgNPs.

The *in vivo* experiment on laboratory rats demonstrated the superiority of Ch/PLA membranes loaded with silver nanoparticles in terms of antimicrobial action on wound infection, promoting more effective wound cleansing and healing compared

to unmodified samples.

Ch/PLA membranes modified with AgNPs showed a moderately pronounced inflammatory process with necrotic tissues and granulation tissue on day 3. By day 10, mature granulation tissue formation with minimal inflammatory infiltration was observed, and by day 21, the tissues were characterized by fibrotic changes with a slight inflammatory response, indicating effective wound healing.

A comprehensive evaluation of these new materials, which demonstrate improved physical, chemical, and biological properties in vitro and in vivo, underscores their potential for biomedical applications in tissue engineering and regenerative medicine.

**Keywords:** chitosan, polylactic acid, electrospinning, nanocomplexes, bionanotechnology, cytotoxicity, biocompatibility, silver nanoparticles, antibacterial activity, purulent wound, wound dressing.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

**Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. **Samokhin Y.**, Varava Y., Diedkova K., Yanko I., Husak Y., Radwan-Pragłowska J., Pogorielova O., Janus Ł., Pogorielov M., Korniienko V. Fabrication and Characterization of Electrospun Chitosan/Poly(lactic Acid) (CH/PLA) Nanofiber Scaffolds for Biomedical Application. *Journal of Functional Biomaterials*. 2023. №14. 414. DOI: 10.3390/jfb14080414. **(Scopus)** *(Дисертант провів експериментальне дослідження, підготував огляд літератури).*
2. Korniienko V., Husak Y., Radwan-Pragłowska J., Holubnycha V., **Samokhin Y.**, Yanovska A., Varava Y., Diedkova K., Janus Ł., Pogorielov M. Impact of Electrospinning Parameters and Post-Treatment Method on Antibacterial and Antibiofilm Activity of Chitosan Nanofibers. *Molecules*. 2022. №27. 3343. DOI: 10.3390/molecules27103343. **(Scopus)** *(Здобувач провів експериментальні дослідження та опрацював результати дослідження).*
3. Korniienko V., Husak Ye., Yanovska A., Altundal S., Diedkova K., **Samokhin Ye.**, Varava Y., Holubnycha V., Pogorielov M. Biological behavior of chitosan electrospun nanofibrous membranes after different neutralization methods. *Prog. Chem. Appl. Chitin and its Deriv.* 2022. No 27. P. 135 – 153. DOI: 10.15259/PCACD.27.010. **(Scopus)** *(Дисертант провів експериментальне дослідження, підготував огляд літератури).*

**Наукові праці, що додатково відображають наукові результати дисертації:**

4. Diedkova K., Roshchupkin A., Varava Y., **Samokhin Y.**, Zahorodna V., Gogotsi O., Baginskiy I., Pogorielov M., Kornienko V., Kyrylenko S. The Multistep Process of Coating PCL Membranes with MXene Solution. *Proceedings of the 2022 IEEE 12th International Conference "Nanomaterials: Applications and Properties", NAP 2022 (2022)*. DOI: 10.1109/NAP55339.2022.9934231. **(Scopus)** *(Здобувач провів експериментальне дослідження, сформулював висновки та список*

*літератури).*

5. Varava Y., **Samokhin Y.**, Savchenko A., Diedkova K., Kyrylenko S., Korniienko V. Antimicrobial Electrospun Chitosan Nanofibrous Membranes Functionalized with Silver Nanoparticles. Proceedings of the 2021 IEEE 11th International Conference "Nanomaterials: Applications and Properties", NAP 2021, 2021. DOI: 10.1109/nap51885.2021.9568584. (**Scopus**) *(Здобувач провів експериментальне дослідження, сформулював висновки, підготував статтю до друку).*

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

6. **Samokhin Y.**, Varava Y. Antibacterial activity of electrospun chitosan/polylactic acid nanofibers loaded with silver nanoparticles. ABSTRACT BOOK BIOMEDICAL PERSPECTIVES International Medical Conference; 2024.

*(Дисертант провів експериментальне дослідження, підготував тези до друку).*

7. **Samokhin Y.**, Diedkova K., Varava Y., et al. Fabrication and Characterization of Electrospun Chitosan/Polylactic Acid (CH/PLA) NanoFiber Scaffolds for Biomedical Application. Book of Abstracts of International conference "YUCOMAT-2023". Herceg Novi. Montenegro. September 4-8, 2023. *(Дисертант провів експериментальне дослідження, підготував тези до друку).*

8. Korniienko V., Husak Y., **Samokhin Y.**, Varava J., Diedkova K. Chitosan electrospun nanofibers: surface morphology and hydrophobicity after different crosslinking. 80th International Scientific Conference of the University of Latvia. Latvian University. Riga, Latvia, February 10-11, 2022. p. 19. *(Дисертант провів експериментальне дослідження, підготував тези до друку).*

9. Korniienko V., **Samokhin Y.**, Varava Y., Diedkova K. Processing and characterization of hybrid chitosan (Ch)/polylactic acid (PLA) composite nanofibrous scaffolds for biomedical application. Book of Abstracts of International conference "YUCOMAT-2022". Herceg Novi. Montenegro. August 29 – September 2, 2022. p. 153. *(Здобувач провів експериментальне дослідження, опрацював результати, підготував тези до друку).*

10. **Samokhin Y.**, Varava Y., Savchenko A., Korniienko V. Chitosan electrospun

membranes with antibacterial properties biomedical applications. 18th International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors. Medical University. Pleven, Bulgaria. 13-th-18-th September, 2021. p. 78. *(Дисертант провів експериментальне дослідження, підготував тези).*

11. **Samokhin Y.**, Diedkova K., Varava Y. Characteristics of electrospun chitosan nanofibrous membranes with different solvents. ABSTRACT BOOK BIOMEDICAL PERSPECTIVES III International Medical Conference; 2021. p. 88. *(Здобувач провів експериментальне дослідження, опрацював результати, підготував тези до друку).*



## ЗМІСТ

ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	27
1.1 Отримання нановолокнистих матеріалів методом електропрядіння.....	27
1.2 Модифікації електропрядених полімерних матеріалів наночастинками металів .....	34
1.3 Використання нановолокнистих матеріалів, отриманих методом електропрядіння, як засобів медичного призначення .....	42
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	48
2.1 Виготовлення та дослідження мембран із хітозану методом електропрядіння .....	48
2.2 Виготовлення та дослідження мембран із хітозану та полімолочної кислоти методом електропрядіння.....	56
2.3 Виготовлення та дослідження електропрядених мембран із хітозану та полімолочної кислоти, навантажених наночастинками срібла.....	62
2.4. Експериментальне дослідження на лабораторних тваринах.....	67
2.5 Статистичний аналіз .....	71
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	72
3.1 Результати дослідження електропрядених мембран із хітозану.....	72
3.2 Результати дослідження мембран із хітозану та полімолочної кислоти методом електропрядіння.....	88
3.3 Результати дослідження електропрядених мембран із хітозану та полімолочної кислоти, навантажених наночастинками срібла.....	97
3.4 Експериментальне дослідження на лабораторних тваринах.....	107
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	117
ВИСНОВКИ.....	128
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	131
ДОДАТКИ.....	158

## СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- AMP – антимікробна резистентність.
- KYO – колонієутворювальні одиниці.
- MIK – мінімально інгібуюча концентрація.
- UZ – ультразвук.
- Ch – хітозан.
- DCM – дихлорометан.
- ECM – позаклітинний матрикс.
- EDX – energy-dispersive X-ray spectroscopy.
- NPs – наночастинки.
- PAM – поліакриламід.
- PAN – поліакрилонітрил.
- PCL – полікапролактон.
- PEO – поліетиленоксид.
- PEG – поліетиленгліколь.
- PLA – полімолочна кислота.
- PP – поліпропілен.
- PS – полістирен.
- PU – поліуретан.
- PVA – полівініловий спирт.
- PVP – полівінілпіролідон.
- SEM – scanning electron microscopy.
- TFA – трифтороуксусна кислота.

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Використання біологічних полімерів, зокрема хітозану, становить великий інтерес завдяки можливості створення нових лікарських засобів та матеріалів медичного призначення. Хітозан має низку корисних властивостей, високу біологічну активність та сумісність із тканинами людини, не забруднює довкілля, оскільки є повністю біодеградуючим, і може бути широко використаним у медицині [1]. Проте властивості хітозану залежать від структурної організації вихідного розчину полімеру, комбінації його з іншими протимікробними агентами, а також від способу виготовлення матеріалів. Доведено, що волокнисті мембрани з хітозану демонструють вищу ефективність, ніж плівки, губки або гелі. У наш час електропрядіння стало одним із найпопулярніших методів отримання нановолокна з різних синтетичних та природних полімерів [2]. Метод електроспінінгу (електропрядіння) дозволяє створювати волокна з нанорозмірними діаметрами, що має важливе значення для біомедичних застосувань, таких як тканинна інженерія та доставка ліків [3]. Таким чином, вивчення питання з використанням методу електроспінінгу для створення нановолокон із хітозану має актуальність через потенційні переваги цих матеріалів у біомедичних застосуваннях, а також через поширення використання новітніх технологій у вирішенні сучасних проблем.

Зростає інтерес до створення нових матеріалів, які можуть бути використані в медичних застосуваннях, зокрема, для створення антимікробних покриттів та матеріалів. Розвиток антимікробних матеріалів є критичним у зв'язку зі зростанням стійкості бактерій до наявних засобів і лікарських препаратів [4].

Використання нановолокон із хітозану дозволяє створювати матеріали з великою площею поверхні, що може покращити ефективність антимікробних властивостей завдяки можливості навантаження наночастинками металів. Розвиток нових підходів у нанотехнологіях може призвести до створення нових гібридних матеріалів для застосувань у медицині та біотехнології [5].

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційна робота виконана на базі Центру колективного користування науковим обладнанням Навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету та виконана відповідно до плану наукових досліджень Навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету в межах проєктів за фінансуванням Міністерства освіти і науки України № 0120U101972 «Композитні нервові кондуїти для лікування критичних дефектів нервів на основі полімерних нанofібрил та струмопровідних матеріалів», № 0123U103300 «Впровадження 2D-двошарових наномембран для керованої регенерації тканин при ендоперіодонтитах та перімплантиті» та № 0124U000552 «Визначення оптимальних параметрів нових нановолокнистих біоматеріалів із гемостатичними властивостями для невідкладної та військової медицини».

**Мета дослідження** – розробити тривимірні волокнисті матеріали методом електропрядіння й модифікувати їх наночастинками срібла, а також установити їх структурні, фізико-хімічні та біологічні властивості.

#### **Завдання дослідження:**

1. Створити нановолокнисті мембрани з хітозану (Ch) методом електропрядіння та визначити оптимальні параметри процесу виготовлення та полімерного розчину, співвідношення розчинників та нейтралізації розчинами лугів виготовлених матеріалів.
2. Дослідити морфологію нановолокнистих електропрядених матеріалів та визначити властивості їх поверхні, параметри деградації й біологічні властивості залежно від співвідношення використаних співрозчинників та застосованих методів нейтралізаційного оброблення.
3. На підставі отриманих оптимальних даних параметрів процесу електропрядіння й нейтралізації розчинами лугів виготовлених нановолокон створити електропрядені мембрани з хітозану (Ch) і полімолочної кислоти (PLA) з покращеними властивостями завдяки поєднанню природного та штучного полімерів, а також поліетиленгліколю (PEG) як співрозчинника.

4. Визначити структурні та функціональні властивості, а також біологічні властивості комбінованих хітозан-полімолочна кислота (Ch/PLA) нановолокнистих мембран залежно від використання поліетиленгліколю (PEG) як співрозчинника.

5. Модифікувати Ch/PLA нановолокнисті мембрани наночастинками срібла (AgNPs), визначити їх морфологію та властивості поверхні, а також біосумісність та антибактеріальні властивості *in vitro* залежно від концентрації наночастинок, якою були модифіковані мембрани.

6. Визначити антибактеріальні властивості та вплив модифікованих наночастинок срібла Ch/PLA нановолокнистих мембран на динаміку загоєння гнійної рани з дослідженням гістологічних та імуногістохімічних параметрів регенераторного процесу.

*Об'єкт дослідження:* тривимірні волокнисті матеріали з інкорпорованими наночастинами.

*Предмет дослідження:* структурні, фізико-хімічні та біологічні властивості мембран, виготовлених методом електропрядіння.

*Методи дослідження:*

1. Електропрядіння полімерних розчинів (створення полімерних розчинів, визначення оптимальних процесів виготовлення нановолокнистих матеріалів).
2. Дослідження фізико-хімічних і структурних властивостей зразків: сканувальна електронна мікроскопія, рентгенівська енергодисперсійна спектроскопія, інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є, вимірювання пористості.
3. Визначення швидкості деградації зразків *in-vitro* в тесті з PBS.
4. Дослідження токсичності та біосумісності на культурах клітин.
5. Визначення антибактеріальних властивостей зразків: дослідження антимікробної та антиадгезивної властивостей на грампозитивних (*S. aureus*) та грамнегативних бактеріях (*E. coli*) *in vitro*.

6. Дослідження *in vivo*: визначення ефективності й безпечності застосування дослідних зразків із використанням бактеріологічних, планіметричних, гістологічних та імуногістохімічних методів.
7. Статистичні методи (застосування параметричних та непараметричних статистичних показників).

### **Наукова новизна отриманих результатів**

Уперше були виготовлені нові мембрани Ch, приготовані з двома співвідношеннями TFA/DCM (7:3 та 9:1) методом електропрядіння з подальшим обробленням водними 1 М NaOH, водними 1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH або Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> спиртовими розчинами. Всі варіанти мембран (як щойно виготовлені, так і після нейтралізації) підтримували клітинну адгезію та проліферацію протягом 6-денного періоду, але оброблення етанолом мембран Ch, виготовлених з 9:1 TFA/DCM, продемонструвало зниження росту клітин. Мембрани Ch, виготовлені з 7:3 TFA/DCM, продемонстрували біосумісність поряд із помірною та більш ефективною антибактеріальною активністю проти *S. aureus* та *E. coli*.

Було вперше доведено, що електропрядені мембрани Ch-TFA/DCM забезпечують бактеріостатичну дію на планктонні форми бактерії та їх біоплівки, швидкість зменшення кількості бактерій була більшою для нановолокон, приготованих за допомогою системи співрозчинників TFA/DCM 9:1 завдяки включенню атомів фтору в ланцюг полімерного ланцюга хітозану. Крім того, результати випробувань показали, що морфологічні властивості електропрядених волокон можуть контролювати утворення біоплівки на нановолокнистих мембранах. Досліджувані матеріали можуть пригнічувати ріст мікроорганізмів до 6 годин, що свідчить про їх більш високий антиадгезивний потенціал і застосовність для антибактеріальних застосувань.

Це дослідження розкрило роль PEG у покращанні структурних і біологічних властивостей електропрядених мембран із включенням PLA і PEG як співрозчинника в модифікацію Ch поряд із постобробленням для поліпшення стабільності нановолокон хітозану у водних розчинах, що дозволило отримати гібридні волокнисті матеріали з помірною швидкістю деградації і зниженим

рівнем гідрофобності.

Це дослідження виявило значний потенціал електропрядених хітозанових мембран як ефективних антимікробних покриттів для біомедичних застосувань. Довело, що інтеграція наночастинок срібла в ці мембрани підвищує й урівноважує їх дозозалежну антибактеріальну ефективність, починаючи з 25–50 мкг/мл, проти *S. aureus* і *E. coli*. Була підтверджена антибіоплівкова активність мембран проти цих бактеріальних штамів.

Уперше на моделі гнійної рани в лабораторних щурів було встановлено, що мембрани Ch/PLA-AgNPs забезпечують швидше загоєння гнійних ран та ефективнішу епітелізацію порівняно з Ch/PLA-мембранами. На 15-й день епітелізація була завершена в щурів із PLA-хлоргексидином та Ch/PLA-AgNPs-мембранами, тоді як з Ch/PLA-мембранами це відбулося на 17-й день. Мікробіологічне дослідження показало, що мембрани Ch/PLA-AgNPs ефективніше знижують рівень бактеріальної колонізації (на 14-ту добу ці мембрани повністю звільнили ранову поверхню від *P. aeruginosa*). Ch/PLA-AgNPs-зразки показали найкращі результати на 21-шу добу щодо зниження рівня запальних маркерів, що свідчить про їх ефективність у прискоренні загоєння та зменшенні запалення.

### **Практичне значення отриманих результатів**

Результати дослідження можуть бути використані для створення нових матеріалів з удосконаленою антимікробною активністю завдяки інкорпорованим наночастинок металів. Це може застосовуватися для створення антимікробних пов'язок та інших матеріалів біомедичного призначення, що можуть ефективно запобігати інфекціям, зокрема, й спричиненим резистентними штамми патогенів.

Отримані результати можуть бути основою для подальших досліджень та вдосконалення матеріалів з антимікробними властивостями.

Матеріали дисертаційного дослідження впроваджені в навчальний та наукові процеси в центрі матеріалознавства (м. Київ), на кафедрі патологічної анатомії НН МІ Сумського державного університету (м. Суми), кафедрі

патологічної анатомії та судової медицини Полтавського державного медичного університету (м. Полтава).

### **Особистий внесок здобувача**

Автор вивчив дані літератури й проаналізував їх, визначив мету і завдання дослідження, обґрунтував актуальність, розробив програму досліджень, виконав оброблення одержаних результатів та їх інтерпретацію з подальшим формулюванням висновків і практичних рекомендацій, оформив дисертацію.

Автор особисто виконав експериментальні дослідження, включаючи виготовлення тривимірних нановолокон з інкорпорованими наночастинками металів, встановлення параметрів електроспінінгу. Здобувач провів дослідження біодеградації мембран, опрацював та проаналізував отримані дані. За безпосередньої участі дисертанта було проведено визначення токсичності та біосумісності, а також дослідження антибактеріальних властивостей. Мікробіологічні дослідження виконані під керівництвом наукового керівника канд. мед. наук, доц. В. В. Корнієнко. Основна частина досліджень була виконана на базі Центру біомедичних досліджень НН МІ СумДУ. Гістологічні та імуногістохімічні дослідження були виконані в співпраці ТОВ «CSD LAB», Київ, Україна. Вимірювання контактного кута було проведено на базі хімічного факультету Сільського технологічного університету, м. Глівіце, Польща. Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є була проведена на базі кафедри біотехнології та фізичної хімії факультету хімічної інженерії та технології Краківського технологічного університету, м. Краков, Польща. Дослідження фізико-хімічних характеристик, сканувальну електронну мікроскопію нановолокон було проведено в Центрі колективного користування науковим обладнанням «Лабораторія матеріалознавства геліоенергетичних, сенсорних та наноелектронних систем» (Сумський державний університет, м. Суми, Україна). Дисертант особисто провів експериментальні дослідження на щурах, які виявили значний потенціал електропрядених хітозанових мембран як ефективних антимікробних покриттів для біомедичних застосувань. Здобувач самостійно виконував хірургічне оброблення гнійних ран експериментальних



тварин та їх планіметричний і загальноклінічний аналіз, провів забір матеріалу з ран для бактеріологічного та гістологічного досліджень. Здобувач написав усі розділи та висновки дисертації. Разом із науковим керівником узагальнено проведені дослідження та їх результати, обговорення, підсумки.

### **Апробація результатів дисертації**

**Основні положення та результати роботи висвітлені на міжнародних науково-практичних конференціях:** IEEE 11th International Conference on Nanomaterials: Applications & Properties. NAP; IEEE 12th International Conference on Nanomaterials: Applications & Properties NAP; «BIOMEDICAL PERSPECTIVES III» International Medical Conference (Sumy, October 26–28, 2021); XVIII International medical scientific conference for students and young doctors, Medical university – Pleven, Bulgaria, 13-th–18-th September, 2021; «Twenty-third annual conference –YUCOMAT 2022 & Twelfth world round table conference on sintering – XII WRTCS 2022», Herceg Novi, August 29 – September 2, 2022; 80th International Scientific Conference of the University of Latvia, Latvian University – Riga, Latvia, February 10–11, 2022; Twenty-fourth YUCOMAT 2023 Conference Herceg Novi, Montenegro, September 4–8, 2023; "BIOMEDICAL PERSPECTIVES IV" International Medical Conference (Sumy, April 24–25, 2024).

### **Публікації**

Матеріали дисертаційної роботи опубліковано в 11 наукових працях: 3 статті в закордонних журналах, що індексується наукометричною базою Scopus, та 8 тез доповідей у матеріалах міжнародних науково-практичних конференцій, 2 з яких індексуються наукометричною базою Scopus.

Участь співавторів полягала в науково-консультативній допомозі та в текстовому оформленні отриманих результатів. Переважна частина наукових результатів була презентована на міжнародних науково-практичних конференціях та семінарах автором особисто. Всі наукові положення й висновки, винесені на захист, належать авторові дисертації.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертацію викладено українською мовою на 163 сторінках, з яких

основного тексту – 112 сторінок. Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, 4 розділів власних досліджень, узагальнення та аналізу отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертаційна робота містить список використаних джерел із 214 найменувань, розміщених на 25 сторінках, 43 рисунки, 1 таблицю та 3 додатки.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### **1.1 Отримання нановолокнистих матеріалів методом електропрядіння**

##### **1.1.1 Принцип методу електропрядіння**

Електроспінінг (електропрядіння) – це досить простий і універсальний метод, який використовує електростатичні сили для створення волокон із полімерних розчинів, точніше, електростатичне відштовхування між поверхневими зарядами для безперервного витягування нановолокон з в'язко-пружної рідини. Його застосовують для успішного виробництва нановолокон діаметром до десятків нанометрів із найрізноманітніших матеріалів, включаючи полімери, кераміку та їх комбінації. Крім суцільних нановолокон із гладкою поверхнею, електроспінінг також був адаптований для отримання нановолокон із низкою вторинних структур, включаючи ті, які характеризуються пористою, порожнистою структурою або структурою «ядро-оболонка». Поверхня та/або внутрішня частина отриманих нановолокон може бути додатково функціоналізована наночастинками під час або після процесу електроспінінгу. Всі ці властивості роблять електропрядені нановолокна добре придатними для широкого спектра застосувань, включаючи ті, що пов'язані з фільтрацією повітря, очищенням води, доставкою ліків, тканинною інженерією та регенеративною медициною [6].

За останні кілька десятиліть електропрядіння швидко прогресувало як простий і універсальний спосіб виготовлення волокон діаметром від мікрометрів до десятків нанометрів з унікальною і складною морфологією. Це привело до створення нових технологій і різноманітних методів, які використовують основні електрогідродинамічні явища процесу електроспінінгу, що сприяло винаходу нових апаратів, які змінили цю галузь. Дослідження з модернізації традиційного електроспінінгу переважно зосереджені на досягненні трьох ключових цілей: масштабування процесу зі збереженням послідовних морфологічних ознак, розроблення 3D- нановолокнистих макроструктур і формулювання нових конфігурацій волокон.

Електроспінінг – це процес виробництва нановолокон за допомогою електростатичних сил, історія якого має декілька важливих етапів розвитку. Процес електроспінінгу має кілька ключових особливостей, які вигідно вирізняють його серед інших методів створення нетканих волокнистих матеріалів. По-перше, цей процес характеризується безперервністю та одночасністю виконання всіх основних стадій в одному робочому просторі, що призводить до негайного отримання готової продукції нетканого волокнистого матеріалу із заданими функціональними та експлуатаційними властивостями. По-друге, електропрядіння дозволяє використовувати різноманітні полімери як сировину і є універсальним щодо технологічного обладнання, що дозволяє виготовляти волокнисті матеріали широкого асортименту та призначення. По-третє, цей процес є гнучким, що дає можливість цілеспрямовано керувати мікроструктурою отриманого волокнистого матеріалу. Четверта й, можливо, найважливіша особливість електроспінінгу полягає у важливості застосування більшості його продукції – насамперед у технологіях, спрямованих на захист природного середовища та забезпечення охорони здоров'я людей.

Перші сучасні дослідження електропрядіння були проведені ще на початку 20-го століття, але тоді цей процес не мав широкого використання [7], [8]. Перші експерименти, пов'язані з електропрядінням, почалися ще в 1930-х роках. Винахідник Anton Formhals отримав кілька патентів на технологію виробництва волокон під впливом електричного поля. Цей винахід відноситься до виробництва штучних волокон і, зокрема, до диспергування або розбивання потоків прядильного розчину на порівняно тонкі волокна за допомогою електричного поля високого потенціалу з певними характеристиками і збирання зазначених волокон, розташованих практично паралельно один одному у вигляді безперервної смуги волокон на рухомому збиральному пристрої. Диспергування потоку прядильного розчину на волокна за допомогою високого електричного потенціалу – це і є «електричне прядіння» волокон. Ці ранні дослідження заклали основу для подальших розробок у цій галузі. Вчені вивчали вплив електростатичних зарядів на струмінь рідини і зазначили, що цей процес може

бути корисним для виготовлення нановолокон [9]. Справжній початок сучасного електроспінінгу датується 70–80-ми роками ХХ століття [10]. На цьому етапі вчені розробили нову технологію та устаткування для створення нановолокон, використовуючи електростатичні заряди та рідини полімерного походження [11]. Цей період відзначився великими досягненнями в області електроспінінгу. У 1990-2000-х роках електроспінінг став досить поширеним методом у біомедицині, матеріалознавстві, електроніці та інших галузях [12].

### **1.1.2 Основи технології електропрядіння**

Основними кроками процесу електроспінінгу є, по-перше, підготовка розчину або розплаву полімеру, для цього обраний полімер розчиняють у відповідному розчиннику або розплавляють до потрібної консистенції, завантажують розчин у шприц, який з'єднаний з капілярною голкою або насадкою, створюють електричне поле шляхом підключення до шприца високої напруги, при цьому протилежний електрод (заземлення) розташовується на збиральній пластині або барабані. Формування краплі полімерного розчину відбувається під дією електричного поля на кінці капілярної голки. При цьому утворюється так званий "конус Тейлора". Витягування волокна відбувається після того, як електричне поле стає достатньо сильним, воно перевершує поверхневий натяг краплі, і тонке полімерне волокно витягується з конуса Тейлора до збиральної пластини. Надалі відбувається збирання волокон, що осідають на збиральній пластині, формуючи нетканий матеріал, і на останньому етапі отримані волокна зазвичай проходять процес сушіння або стабілізації для видалення залишків розчинника і покращання механічних властивостей. Отримані нановолокна можуть бути фіксовані або оброблені, наприклад, нагріванням або хімічною модифікацією для забезпечення стабільності та покращання їх властивостей [13], [14].

### **1.1.3 Аналіз наявних методів та технологій електропрядіння**

Методи електропрядіння в біомедицині можуть включати кілька ключових аспектів. Один із них – електроспінінг, який використовують для формування нановолокон із різних полімерів або їх комбінацій. Цей метод широко

використовують для створення матеріалів, таких як носії ліків, тканинні імплантати та інші біомедичні конструкції [15].

Іншим важливим методом є електророзпилення (electrospray), що використовується для отримання мікро- та наночастинок. Цю техніку широко застосовують для створення мікрокапсул та контрольованої доставки лікарських речовин. Електророзпилення дозволяє отримувати частинки різного розміру та форми, що важливо для розроблення нових матеріалів і систем доставки для фармацевтичних та медичних потреб [16].

Електродрукування (electroprinting) використовують для створення тривимірних структур шляхом нанесення шарів матеріалу один на інший. Цей метод застосовують для створення тканинних інженерних конструкцій, біосенсорів та інших біомедичних пристроїв. Електродрукування дозволяє точно контролювати форму й розміри створюваних об'єктів, що робить його потужним інструментом у розробленні нових біомедичних матеріалів [17].

Загалом, для виробництва нановолокон «ядро / оболонка» найчастіше використовують два методи: емульсійний та коаксіальний методи електропрядіння. Під час емульсійного електропрядіння емульсія двох окремих полімерів подається в шприц із капілярною насадкою, тоді як під час коаксіального електропрядіння розчини «ядра» та «оболонки» подаються окремо в коаксіальну насадку. З цих двох методів коаксіальне електропрядіння зазвичай вважається одним із найбільш універсальних методів для виготовлення цих типів нановолокон [18].

У коаксіальному електропрядінні використовують дві концентрично вирівняні насадки й коаксіальний струмінь двох різних рідин, що одночасно протікає через зовнішній і внутрішній капіляри. На обидві насадки накладається одна й та сама напруга та деформується крапля. В ідеальному випадку утворюється нановолокно з «ядром / оболонкою», яке консолідується під час випаровування розчинника та розтягування. Співвідношення подачі двох компонентів впливає на однорідність і стабільність волокна [19]. У кінці деформованої краплі утворюється струмінь, і, в ідеальному випадку,

утворюється нановолокно з «ядром / оболонкою». При ближчому розгляді стає очевидним, що коаксіальне електропрядіння включає низку складних фізичних процесів, які були досліджені експериментально лише до певної міри і потребують математичного моделювання. Інші параметри, такі як розмір коаксіального капіляра, прикладене електричне поле, швидкість подачі об'єму, відокремлення рідин «ядра / оболонки», їх в'язкість та провідність, також відіграють важливу роль у створення однорідних коаксіальних струмінів та морфології нановолокон, що утворюються цим методом електропрядіння [20].

Хоча коаксіальне електропрядіння потребує більш складних налаштувань конфігурації, ніж емульсійне електропрядіння, воно все ще має значні переваги через певні недоліки останнього. Емульсійне електропрядіння обмежене невзаємодійним електропрядінням полімерів, тоді як окремі канали у коаксіальному електропрядінні дозволяють виготовляти «ядро / оболонкові» волокна навіть для двох сумісних полімерів. Крім того, в деяких випадках емульсійного електропрядіння замість стійкого ядра будуть утворюватися окремі бульбашки ядра, вбудовані в полімер оболонки, що не є бажаним [21].

#### **1.1.4 Параметри електропрядіння та їх вплив на властивості отриманих нановолокон**

Існує кілька факторів, що впливають на процес електропрядіння. Ці фактори класифікують як параметри електроустановки, параметри розчину та навколишнього середовища. Електричні параметри включають прикладене електричне поле [22], [23], відстань між голкою та колектором, швидкість потоку та діаметр голки. Параметри розчину включають в себе розчинник, полімерну концентрацію, в'язкість і провідність розчину [24], [25]. Параметри навколишнього середовища включають відносність вологості й температури. Всі ці параметри безпосередньо впливають на вироблення гладких і без потовщень електропрядених волокон. Критичне значення прикладеної напруги змінюється від полімеру до полімеру. Формування нановолокон меншого діаметру зі збільшенням прикладеної напруги пояснюється розтягуванням полімерного розчину в кореляції з відштовхуванням заряду всередині полімерного струменя.

Збільшення прикладеної напруги за межі критичного значення призведе до утворення потовщень на нановолокнах. Збільшення діаметра та утворення нановолокон із колбоподібними потовщеннями зі збільшенням прикладеної напруги пояснюється зменшенням розміру конуса Тейлора і збільшенням швидкості струменя за тієї самої швидкості потоку [26]. Вплив відстані від голки до колектора та діаметра голки відіграє важливу роль у визначенні морфології електропряденого нановолокна [27], [28].

Процесні змінні, розчин і параметри навколишнього середовища можна аналізувати для знаходження оптимальних експериментальних умов для виробництва нановолокон для конкретного застосування. Таким чином, можна поєднати використовуваний полімер з умовами процесу, щоб отримати волокна з відповідними властивостями залежно від типу застосування. Важливим аспектом процесу електропрядіння є тип колектора, що використовується [29]. У цьому процесі колектор служить провідною підкладкою, на якій збираються нановолокна. Зазвичай як колектор використовують алюмінієву пласку пластину, проте через складність перенесення зібраних волокон та необхідність отримання вирівняних волокон для різних застосувань почали досліджувати інші колектори, такі як обертові стрижні та барабани [30].

Подібно до застосованого електричного поля, в'язкості та швидкості потоку, відстань між металевим наконечником голки та колектором також залежить від полімерної системи. Численні дослідження вивчили ефект відстані між наконечником голки і колектором і прийшли до висновку, що дефектні нановолокна великого діаметра утворюються, коли ця відстань залишається невеликою, в той час як діаметр нановолокна зменшується в міру збільшення відстані. Концентрації полімерів і в'язкість розчину також впливають на процес електроспінінгу, який спирається на явище одновісного розтягування зарядженого струменя. Наприклад, коли концентрація полімерного розчину низька, застосоване електричне поле та поверхневий натяг викликають розрив заплутаних полімерних ланцюгів на фрагменти, перш ніж досягти колектора. Ці фрагменти викликають утворення потовщень на нановолокнах. Збільшення



концентрації полімерного розчину призведе до збільшення в'язкості, що потім збільшує ланцюгову заплутаність серед полімерних ланцюгів [31], [32], [33].

Провідність розчину не лише впливає на формування конуса Тейлора, а й допомагає контролювати діаметр нановолокон. Якщо розчин має меншу провідність, поверхня краплі не буде мати заряду для формування конуса Тейлора, в результаті цього не відбудеться електроспінінгу. Збільшення провідності розчину до критичного значення не лише збільшить заряд на поверхні краплі, щоб сформувати конус Тейлора, а й приведе до зменшення діаметра волокна [34], [35].

Вибір розчинника є одним із ключових факторів для формування гладкого електропряденого нановолокна. Зазвичай перед вибором розчинника потрібно мати на увазі дві речі. По-перше, кращими розчинниками для процесу електроспінінгу є полімери, які повністю розчинні. По-друге, розчинник повинен мати помірну температуру кипіння. Зазвичай перевагу надають легким розчинникам, оскільки їх високі швидкості випаровування сприяють легкому випаровуванню розчинника з нановолокна під час їх руху від кінчика голки до колектора. Однак високолеткі розчинники здебільшого уникаються, тому що їх низькі температури кипіння й високі швидкості випаровування призводять до висихання струменя на кінчику голки. Це висихання заблокує кінчик голки, що відповідно заважатиме процесу електроспінінгу. Аналогічно, менш легкі розчинники також уникаються, оскільки їх високі температури кипіння перешкоджають їх висиханню під час руху струменя нановолокна.

Використання циліндричних та обертових колекторів, що обертаються з високою швидкістю, може вирівнювати волокна в окружному напрямку. Проте вирівнювання волокон досягалося лише до певної міри, і волокна малого діаметру залишалися випадково орієнтованими. Інший спосіб полягає у використанні двох смуг металу, розділених порожниною на декілька сантиметрів, що призводить до змін у дії електростатичних сил, це призводить до тягучості заряджених волокон для вирівнювання їх перпендикулярно [36]. Основна відмінність між типами колекторів полягає у вирівнюванні волокон.

Дослідження показують, що більш вирівняні волокна дозволяють покращити механічні властивості [37].

Крім параметрів електропрядіння та розчину, екологічні (навколишні) фактори, такі як відносна вологість і температура [38], [39], [40], [41], також впливають на діаметр та морфологію нановолокон. Вологість спричиняє зміни діаметра нановолокон, контролюючи процес затвердіння зарядженого струменя [42]. Зі збільшенням температури вологість зменшується, оскільки випаровування розчинника відбувається швидше. Через це висока вологість призводить до утворення товстіших волокон. Через вигинні нестабільності струменів волокон, отриманих за допомогою електропрядіння, часто відкладаються на поверхні колектора випадковим чином. Кілька підходів намагаються контролювати рух струменів за допомогою розподілу електричного поля і показують тенденцію до того, що зібрані волокна вирівнюються в осьовому напрямку. Однак це дуже складна мета для досягнення у випадку нановолокон, отриманих електропрядінням, оскільки траєкторія полімерного струменя має дуже складну тривимірну форму, спричинену вигинними нестабільностями, а не прямолінійним шляхом. У випадку пластин, таких як колектор, струмінь переміщується вбік і утворює серію котушок, оболонка яких має форму конуса, що відкривається в напрямку, протилежному до контрелектрода, що призводить до абсолютно випадкових і невирівняних насаджень [43].

## **1.2 Модифікації електропрядених полімерних матеріалів наночастинками металів**

### **1.2.1 Полімерні матеріали, застосовувані для виготовлення нановолокон методом електропрядіння**

Полімери – це високомолекулярні сполуки, що складаються з повторюваних структурних одиниць, які називаються мономерами. Ці мономери з'єднуються між собою хімічними зв'язками, утворюючи довгі ланцюги. Полімери можуть бути природними або синтетичними й мають широкий спектр властивостей, що робить їх важливими для різних галузей медицини та біології.

Полівініловий спирт (PVA), поліакрилонітрил (PAN), полікапролактон (PCL), поліуретан (PU), полістирен (PS), поліпропілен (PP), полівінілпіролідон (PVP), поліакриламід (PAM) – це лише деякі з синтетичних полімерів, застосовувані в електроспінінгу для створення нановолокон [44], [45], [46]. Серед природних полімерів для цієї мети часто використовують колаген, фіброїн, желатин та хітозан / хітин [47].

Наприклад, полівініловий спирт (PVA) відомий своєю водорозчинністю та високою міцністю, що робить його ідеальним для створення нановолокон із великою поверхнею. Поліакрилонітрил (PAN) використовують для створення мембран із нановолокон, які ефективно фільтрують рідини й захищають від бактерій. Полікапролактон (PCL) є біодеградабельним полімером, що знаходить застосування в тканинній інженерії та доставці ліків через створення нановолоконних носіїв [48], [49], [50].

У той час як поліуретан (PU) широко використовують у медичних застосуваннях через свою м'якість та гнучкість, поліпропілен (PP) зазвичай застосовують у текстильній промисловості через свою легкість і стійкість до ударів. Полівінілпіролідон (PVP) використовують у медицині для виробництва нановолокон для лікувальних пов'язок, а поліакриламід (PAM) – у водонепроникних нановолоконних матеріалах, наприклад, для очищення води [51], [52], [53], [54], [55], [56].

Хітозан, який використовується у процесі електроспінінгу, має декілька важливих характеристик. По-перше, його біосумісність дозволяє використовувати його в різних біомедичних застосуваннях. Крім того, антимікробні властивості хітозану сприяють загоєнню ран та запобіганню інфекцій. Його здатність формувати нановолокна легко перетворює його на вигідний матеріал для створення матеріалів із великою поверхнею та контрольованими порами. Додатковим плюсом є його біодеградація, що робить його ідеальним для використання в біомедичних застосуваннях. Полегшена доступність хітозану з природних джерел також сприяє його використанню в багатьох галузях. Хітозан може взаємодіяти з іншими полімерами, і ця спільна

взаємодія може призвести до створення комбінованих полімерних матеріалів із покращеними властивостями [57], [58], [59].

Полімолочна кислота (PLA), яку також використовують для створення нановолокон, має свої унікальні властивості. PLA є складним полієфіром, що складається з множинних молекул молочної кислоти. PLA є полімером, утвореним з агломерованих молекул молочної кислоти, відомим також як полілактид. Він синтезується шляхом полімеризації молекул молочної кислоти, де гідроксильна група однієї молекули й карбоксильна група іншої молекули взаємодіють, утворюючи полімерні ланцюги. Його біорозкладність та біосумісність роблять PLA придатним для широкого спектра біомедичних застосувань. Регулюючи кристалічність та кополімеризацію з ізомерами або іншими мономерами, можна контролювати швидкість біодеградації як в лабораторних умовах, так і в живих організмах. Зазвичай деградація PLA починається з гідролізу, після цього відбувається дія ферментів або мікроорганізмів, що в кінцевому підсумку приводить до розпаду PLA на нешкідливі продукти. Завдяки цьому PLA широко використовують таких галузях, як системи доставки ліків, хірургічні шви та імплантаційні матеріали.

Поєднання PLA з хітозаном в одному розчині дає можливість створення біокомпозитів із різноманітними характеристиками, що задовольняють потреби різних галузей. Цей підхід дозволяє використовувати переваги кожного матеріалу для створення матеріалів зі специфічними властивостями. PLA відомий своєю міцністю й жорсткістю, що робить його відмінним для виробництва біопластиків та біокомпозитів із високою механічною довговічністю. Змішування PLA та хітозану в одному розчині дозволяє створювати матеріали з різними властивостями та характеристиками залежно від співвідношення компонентів та умов оброблення [60], [61], [62].

### **1.2.2 Фізико-хімічні та біологічні властивості нановолокнистих структур**

Нановолокнисті структури – це матеріали, які складаються з волокон або ниток із нанометровими розмірами в діаметрі та мікроскопічною довжиною.

Вони відрізняються від звичайних волокон за розміром, оскільки їх діаметри знаходяться в масштабі нанометрів (1 нанометр = 1 мільярдний дільник метра) [63], [64], [65], [66].

З одного боку, фізико-хімічні властивості нановолокон дають їм здатність бути ефективними фільтрами, мембранами та іншими матеріалами з контрольованим розміром. Їх пориста структура дозволяє зберігати та віддавати рідини та газу, забезпечуючи точну й контрольовану доставку речовин у різних застосуваннях [67]. Велике співвідношення поверхні до об'єму забезпечує високу реакційну здатність та адсорбційну ємність. Розмір і морфологію нановолокон можна точно контролювати шляхом регулювання умов синтезу, таких як концентрація розчину, в'язкість, швидкість збирання, вологість та електричне поле під час електроспінінгу. Нановолокна можуть бути виготовлені з різним ступенем пористості, що дозволяє налаштувати їх проникність та адсорбційні властивості для конкретних застосувань. Нановолокнисті структури зазвичай демонструють високу міцність на розтяг і модуль пружності завдяки високій молекулярній орієнтації та меншій кількості дефектів у матеріалі.

Біологічні властивості нановолокон включають в себе хорошу біосумісність, біорозкладність, контрольоване вивільнення ліків та антибактеріальну активність. Нановолокна можуть бути розроблені з матеріалів, які є біосумісними, тобто не спричиняють негативних реакцій під час контакту з біологічними тканинами. Багато нановолоконних матеріалів є біологічно сумісними [68], [69], [70], що мінімізує ризик імунної відповіді або токсичності під час контакту з біологічними тканинами. Деякі нановолокна можуть бути створені з біорозкладних матеріалів, що забезпечує їх розпад в організмі без утворення шкідливих продуктів розпаду. Нановолокнисті структури можуть бути використані як системи для контрольованого вивільнення ліків, що забезпечує поступове й стабільне надходження активних речовин в організм. Нановолокна можуть бути завантажені біоактивними речовинами, такими як лікарські речовини або біомолекули, для сприяння певним біологічним реакціям [71], [72] та впливати на клітинну адгезію, розмноження та диференціацію [73],

[74], [75]. Можливість утворення нанокompозитів із нановолокон використовують як матрицю для вбудовування наночастинок або наноструктур [76], [77]. Нановолокна, імпрегновані металевими наночастинами (наприклад, сріблом або міддю), можуть мати виражену антибактеріальну дію [78]. Ще однією важливою властивістю нановолокон є сприяння клітинній адгезії та проліферації, що є важливим для застосувань у тканинній інженерії та загоєнні ран [79].

### **1.2.3 Наночастинки металів – види та їх біомедичне застосування**

Одним із перспективних шляхів у боротьбі зі зростаючою полірезистентністю є пошук нових засобів з антимікробною активністю. Розвиток нанотехнологій надав нового поштовху до використання металів як антимікробних засобів.

Наночастинки на основі металів як антимікробні засоби відносять до дрібних металевих частинок із принаймні одним розміром у тривимірному просторі в діапазоні 1–100 нм. Вони характеризуються малим розміром, великою площею поверхні та ефектами квантового розміру [80]. Ці властивості відрізняють їх від фізико-хімічних характеристик макроскопічних металів. Наночастинки на основі металів (таких як AgNPs і CuNPs) були широко вивчені й доведено, що вони легко синтезуються, є стабільними, біосумісними та легко біодеградують [81]. Їх антибактеріальний механізм відрізняється від звичайних антибіотиків, що ускладнює бактеріям розвивати резистентність. Металеві NPs можуть убивати мікроорганізми, безпосередньо контактуючи з ними, викликаючи вироблення активних форм кисню, які можуть пошкодити ДНК, РНК, білки та інші речовини всередині [82]. Потрапивши всередину клітини, металеві NP можуть вільно взаємодіяти з клітинними структурами (наприклад, мембранами, рибосомами, білками, ДНК, РНК), порушуючи функції клітин [83].

Наночастинки міді є перспективним матеріалом для боротьби з інфекціями [84]. Відомо, що мідь у нульовій валентності та оксид міді мають антимікробні властивості проти вірусів, грибів, грампозитивних і грамнегативних бактерій. Наночастинки міді поєднують унікальні біологічні, фізико-хімічні та

фармакологічні властивості з антибактеріальною, протигрибковою та противірусною дією, що робить їх перспективними як антимікробні агенти нового покоління [85]. Антибактеріальна ефективність наночастинок оксиду міді (CuO) дещо нижча, ніж у наночастинок срібла (Ag) або оксиду цинку (ZnO), тому для досягнення тих самих результатів потрібна більша концентрація [86]. Ефективність наночастинок CuO залежить від розміру, форми та типу бактерій. Вони демонструють активність проти грамполозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, таких як *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* [87]. Оскільки виробництво наночастинок міді є економічно вигіднішим порівняно з іншими нанометалами, їх використання у складі нанокомпозитів є привабливим. Висока здатність наночастинок Cu до окиснення спонукає до пошуку нових методів їх синтезу та стабілізації [88]. Розробляють способи підвищення антибактеріальної активності та зниження токсичності металевих наночастинок, зокрема, через комбінування різних металів або їх оксидів у розчинах, сумішах або хелатованих формах [89].

Переваги наночастинок золота як антибактеріальних засобів включають таке: золоті наноматеріали відзначаються високою біобезпекою завдяки хімічній інертності золота, а їх поглинання та метаболізм можуть бути керовані через дизайн матеріалу [90]. Антибактеріальні ефекти наночастинок золота (AuNPs) можна посилити, маніпулюючи такими властивостями, як розмір, форма та поверхня, а також змінюючи поверхню різними молекулами [91]. Золоті наноматеріали рідше викликають бактеріальну стійкість порівняно зі стандартними антибіотиками. Крім того, наночастинки золота можуть бути функціоналізовані природними антиоксидантами, біологічними лігандами, різними органічними молекулами та дендримерами [92]. Функціоналізовані золоті наноматеріали мають переваги в поверхневому заряді, розмірі, орієнтації на бактеріальні рецептори, біосумісності та ефективній інтерналізації [93].

Серед різних неорганічних наночастинок, наночастинки срібла виглядають найперспективнішими завдяки своїй ефективності та широкому застосуванню в різних галузях. З появою штамів бактерій, стійких до

антибіотиків, срібло набуло нового, хоча й дещо суперечливого значення. У невеликих кількостях срібло не шкодить клітинам людини, але є згубним для мікробних клітин. Антимікробна ефективність срібла залежить від розміру частинок. AgNPs із полімером PVP більш стабільні, менш токсичні та мають кращу антимікробну активність порівняно з іншими AgNPs [94]. Висока поверхнева енергія може знижувати їх ефективність через схильність до агрегації, що призводить до втрати антибактеріальної активності. Тому правильний вибір методу синтезу та стабілізуючого агента є критичним для біомедичного застосування наночастинок срібла. Встановлено, що срібло ефективно бореться з різними патогенами як *in vitro*, так і *in vivo* [95]. Найбільш дослідженим є антибактеріальний механізм дії срібних наночастинок. Основними механізмами є контактна бактерицидна дія бактерій та іонно-опосередковане руйнування, що призводить до порушення проникності бактеріальної мембрани, індукції окиснювального стресу, пригнічення синтезу білків та нуклеїнових кислот. Проте залишаються відкритими питання щодо визначення мінімальної інгібуючої концентрації срібла (МІК), можливості виникнення стійких до наносрібла штамів, впливу на біоплівки та планктонні клітини, а також побічних ефектів на людину. Однією з проблем застосування наночастинок срібла в медицині є їх виведення з організму, що може призводити до накопичення й токсичності [96], [97]. Для вирішення цієї проблеми було застосовано комбінування AgNPs з традиційними антибактеріальними засобами (наприклад, хлоргексидином). Деякі дослідження показали ефективність поєднання AgNPs з колагеном, целюлозою тощо, що забезпечує значну антибактеріальну активність та безпеку *in vitro* та *in vivo* для клітин і навколишніх тканин [98].

#### **1.2.4 Методи модифікації електропрядених матеріалів наночастинками**

Створення електропрядених полімерних матеріалів із посиленими антибактеріальними властивостями має декілька ключових причин: посилення антимікробних властивостей, забезпечення тривалої дії та розширення сфер



застосування [99]. Антибактеріальні властивості матеріалів допомагають у запобіганні розвитку та поширенню шкідливих мікроорганізмів, знижують ризик зараження та активно протидіють формуванню бактеріальної біоплівки [100].

Нановолокна та наночастинки є матеріалами з товщиною або діаметром, меншим, ніж мікромметр (субмікрометрові розміри). Нановолокна та наночастинки з однаковим діаметром мають різні поверхневі площі. Зазвичай наночастинки мають більшу поверхневу площу порівняно з нановолокнами за однакового діаметра. Однак, коли виникає потреба в повторному використанні наночастинок, це створює труднощі під час їх відділення від середовища дисперсії. Тому комбінація властивостей наночастинок і нановолокон може бути цікавою стратегією.

Функціональність нановолокон прямо пов'язана з наночастинками, які інкорпорується під час або після електропрядіння. Залежно від бажаної мети застосування нановолокон / наночастинок наночастинки металоксидів, цеолітів, ферментів, адсорбентів використовують разом із нановолокнами для отримання різних фізичних / хімічних або біологічних властивостей [101].

Модифікація нановолокон за допомогою технік, які використовуються після електропрядіння, є перспективною альтернативою для сприяння змінам на поверхні. Вона надає бажані характеристики шляхом уведення нових хімічних груп на поверхню нановолокон, перетворення вже наявних функціональностей на більш бажані або видалення частин існуючої поверхні [102]. Крім того, це економічно доцільно на промисловому рівні. Широкий спектр матеріалів і технік, використовуваних для проведення модифікацій для різних цілей, може бути застосований для диспергування наночастинок у полімерних волокнах [103].

### **1.3 Використання нановолокнистих матеріалів, отриманих методом електропрядіння, як засобів медичного призначення**

#### **1.3.1 Галузі застосування електропрядених нановолокнистих матеріалів у медицині**

Використання нановолокнистих матеріалів, які отримують за допомогою електропрядіння, стає ключовим напрямком у медичних дослідженнях та біотехнологічних розробках. Ці тонкі, волокнисті матеріали мають відносно велику площу поверхні та високий вміст пор, що надає їм унікальних властивостей для медичних застосувань. Нановолокна різної морфології можуть бути отримані шляхом зміни параметрів, таких як концентрація розчину, в'язкість, швидкість обертання колектора, вологість та інші, або шляхом модифікації компонентів електроспінінгового обладнання. Вони можуть бути хаотично орієнтованими, вирівняними, пористими, непористими, гладкими, шорсткими, складчастими, жолобчастими або мати структуру типу "ядро / оболонка". Різні структурні особливості нановолокон визначають їх численні застосування. Останнім часом нановолокна широко використовують у біомедичній сфері [104].

Різні види лікарських препаратів активно доставляють за допомогою електропрядених нановолокон завдяки їх численним перевагам, таким як біорозкладність, простота виробництва у великих масштабах, контрольоване вивільнення ліків [105], велике співвідношення площі поверхні до об'єму тощо. Різноманітні модифіковані препарати, включаючи білки та пептиди, антитіла і малі молекулярні сполуки, можуть бути включені в нановолокна для доставки до цільових місць з метою досягнення більш ефективних терапевтичних результатів завдяки контрольованому вивільненню. Для включення гідрофобних препаратів у нановолокна вони попередньо розчиняються в органічному розчиннику разом із полімером [106].

Тканинна інженерія також становить великий інтерес [107]. Її метою є відновлення, заміна, підтримка або покращання функцій певних тканин або органів [108]. Зараз тканинну інженерію застосовують у створенні біомедичних

позаклітинних матриць (ЕСМ), виготовленні ферментів, кровоносних судин, генів та препаратів для відновлення шкіри, хрящів і нервів [109]. Тканинна інженерія поєднує клітинну біологію, хімію та біоматеріали для створення тривимірних тканин, які імітують структуру біологічних мембран або ЕСМ. Зазвичай для цього використовують матриці з нановолокон, виготовлених, зокрема, й методом електроспінінгу [110]. Вони відповідають вимогам тканинної інженерії завдяки біосумісності, механічним властивостям, проникності та здатності до біодеградації в організмі людини [111]. Для надання нановолокнам специфічних властивостей та адаптації їх до функцій ЕСМ у тканинах, до них додають різні добавки [112]. Нановолокна застосовують в інженерії кісткової тканини, хрящової тканини, сухожиль і зв'язок, нервової тканини, серцево-судинної тканинної інженерії тощо, що свідчить про їх широку використовуваність у медичній хірургії [113]. Хірургічні матеріали, такі як шви та біосумісні покриття для імплантатів, також можуть бути виготовлені з нановолокон, що підвищує їх ефективність і безпеку [114], [115].

### **1.3.2 Використання електропрядених нановолокнистих матеріалів як ранових покриттів**

Рани – часте явище в роботі лікарів як хірургічних, так і нехірургічних спеціальностей. Зростання кількості гнійних захворювань, післяопераційних ускладнень, випадків генералізації інфекцій та токсикоалергічних реакцій, а також незадовільні результати лікування свідчать про актуальність проблеми гнійної інфекції в хірургії та її соціально-економічну значущість. Рана (*vulnus*) – це механічне ушкодження з порушенням цілісності шкіри або слизових оболонок, що відрізняє її від забою, розриву чи розтягнення. Види ран за ступенем інфікування: асептичні – операційні рани, що гояться швидко, свіжоінфіковані – рани, нанесені поза операційною протягом трьох діб, гнійні – інфіковані рани з розвитком інфекційного процесу, некрозом і гнійним ексудатом. Лікування гнійних ран включає місцеве та загальне лікування залежно від фази ранового процесу [116]. У фазі запалення важливо боротися з інфекцією, забезпечити дренажування ексудату та очищення від некротичних

тканин. Використовують гігроскопічні пов'язки, гіпертонічний розчин, ультразвукову кавітацію, вакуумне оброблення, лазерну терапію. У фазі регенерації застосовують мазі, що стимулюють репаративні процеси, наприклад, метилурацилова мазь, "Солкосерил", "Актовегін". У фазі утворення рубця використовують стимулювальні мазі та фізіотерапію. Загальне лікування включає антибактеріальну терапію, дезінтоксикацію, імунокорекцію та протизапальну терапію. Використовують антибіотики, бактеріофаги та протизапальні засоби [117]. Пов'язки захищають рани та фіксують перев'язувальний матеріал. Розрізняють м'які та тверді фіксувальні пов'язки. М'які пов'язки складаються з перев'язувального матеріалу й засобу фіксації, зокрема, захисні, лікарські, гемостатичні та оклюзійні [118].

У сфері лікування ран нановолокна створюють бар'єри, що захищають рани від інфекцій та сприяють їх швидкому загоєнню. Ранове покриття зазвичай потребує пористості від 500 до 1 000 нм, достатньої для захисту рани від зовнішніх впливів або мікроорганізмів. Зазвичай наш організм не може відновити глибокі рани, оскільки клітини, які беруть участь у лікуванні або проліферації, пошкоджені травмою, що призводить до тривалого процесу повторної епітелізації. Нановолокнисті матеріали, ефективно захищаючи ранову поверхню від мікробної контамінації, сприяють ефективній регенерації ушкоджених тканин. Нановолокна використовують у ранових бинтах та пов'язках. Також їх застосовують у тканинній інженерії, де використовують для росту різних типів тканин і створення штучних органів [119], [120], [121].

Електропрядені матеріали стають усе більш популярними в медицині, зокрема, в лікуванні ран [122]. Вони являють собою нановолокна, виготовлені за допомогою процесу електропрядіння, що дозволяє створювати тонкі волокна з полімерів і композитів, які можуть мати різноманітні біомедичні застосування. Перевагами використання електропрядених матеріалів є високе відношення площі поверхні до об'єму матеріалу, що сприяє кращій взаємодії з клітинами, що важливо для загоєння ран, оскільки велика поверхня дозволяє ефективніше доставляти кисень і поживні речовини до ушкодженої ділянки, пориста

структура електропрядених нановолокон забезпечує хорошу вентиляцію та дренаж рідини, що критично важливо для лікування ран, що сприяє зменшенню ризику інфекцій і прискоренню процесу загоєння [123]. Нановолокна, отримані методом електропрядіння, нагадують природний екстраклітинний матрикс, що створює сприятливе середовище для прикріплення, міграції та проліферації клітин, це сприяє швидшій регенерації тканин і загоєнню ран, вони можуть бути завантажені різними терапевтичними агентами (антибіотики, фактори росту) для їх поступового й контрольованого вивільнення, що дозволяє забезпечити тривалий антимікробний ефект та підтримку процесу загоєння. Багато електропрядених матеріалів, таких як хітозан і полімолочна кислота, є біосумісними та біодеградуваними, що мінімізує ризик виникнення негативних реакцій і усуває потребу в їх видаленні після загоєння рани. Включення антимікробних агентів, таких як срібні наночастинки, наночастинки золота або міді до складу електропрядених матеріалів може забезпечити ефективний захист від бактеріальних інфекцій [124].

Але існують і недоліки у використанні електропрядених матеріалів під час лікування ран. Це насамперед складність процесу електропрядіння, що залежить від багатьох параметрів, таких як концентрація полімеру, система розчинників, напруга, і відстань між голкою та колектором. Це може ускладнювати виготовлення однорідних і високоякісних нановолокон [125]. Нановолокна, отримані методом електропрядіння, можуть мати недостатню механічну міцність для деяких застосувань, особливо коли потрібні високі значення розривної сили й довговічність. Деякі електропрядені матеріали, особливо ті, що містять металеві наночастинки, такі як срібло, золото або мідь, можуть мати цитотоксичний вплив на клітини ссавців. Це потребує ретельної оцінки та оптимізації для забезпечення їх безпечності [126]. Ще має значення можливість досягнення бажаної швидкості деградації електропрядених матеріалів. Матеріали, що розкладаються занадто швидко, можуть втратити свою структурну цілісність, тоді як ті, що розкладаються занадто повільно, можуть спричинити тривале запалення. Проблема підвищення стабільності й

функціональності електропрядених нановолокон (наприклад, зшивання, нейтралізація) ускладнює та здорожчує вартість виробництва [127].

Композитні ранові пов'язки та покриття, створені методом електропрядіння з декількох полімерів або наночастинок, стають усе більш популярними в сучасній медицині завдяки їх унікальним властивостям та ефективності щодо лікування ран. Ці матеріали поєднують переваги різних компонентів, забезпечуючи комплексний підхід до загоєння ран. Комбінація хітозану та PLA в електропрядених мембранах сприяє швидкому загоєнню ран завдяки біосумісності та біодеградабельності. Хітозан забезпечує антибактеріальний ефект, тоді як PLA додає механічної міцності. Такий композитний матеріал часто застосовують для лікування хронічних ран та опіків. Комбінація поліуретану та полікапролактон (PCL) забезпечує еластичність та здатність до розтягування, а PCL додає структурної міцності та сприяє повільному вивільненню лікарських засобів [128]. Такі пов'язки ефективні під час оброблення ран із високим рівнем ексудації. Останнім часом широко використовують композити з наночастинками, наприклад, включення срібних наночастинок до складу полімерних пов'язок, що значно підвищує їх антибактеріальні властивості. AgNPs ефективно знищують широкий спектр мікроорганізмів, запобігаючи розвитку інфекцій [129]. Такі пов'язки часто використовують у хірургічній практиці та під час лікування заражених ран, ZnO NPs в електропрядених пов'язках сприяють швидкому загоєнню ран завдяки їх антибактеріальним та протизапальним властивостям. Вони також стимулюють ріст нових клітин, що робить їх корисними для лікування гострих ран. Багатокомпонентний підхід поєднує антибактеріальні властивості хітозану та срібних наночастинок із регенеративними властивостями колагену. Цей тип пов'язок сприяє швидкому загоєнню та регенерації тканин, що особливо важливо для лікування глибоких і тяжких ран [130].

Отже, електропрядені нановолокнисті матеріали мають значний потенціал у медичній сфері завдяки своїм унікальним властивостям. Їх використовують для доставки лікарських препаратів, тканинної інженерії та створення ранових

покриттів. Основні переваги таких матеріалів включають біорозкладність, можливість контрольованого вивільнення ліків, високе співвідношення площі поверхні до об'єму та пористу структуру, що забезпечує хорошу вентиляцію й дренаж рідини. Це дозволяє ефективно захищати рани від інфекцій та сприяє швидкій регенерації тканин.

У тканинній інженерії активно використовують нановолокна для відновлення різних типів тканин і створення біомедичних позаклітинних матриць. Завдяки своїй біосумісності, механічним властивостям та здатності до біодеградації, нановолокнисті матеріали застосовують для відновлення шкіри, хрящів, нервів, а також у серцево-судинній інженерії.

Особливе місце займають нановолокна в лікуванні ран. Вони створюють бар'єри, що захищають від інфекцій та сприяють швидкому загоєнню завдяки своїм антимікробним властивостям і здатності до поступового вивільнення лікувальних агентів. Проте існують і недоліки, пов'язані з процесом електропрядіння, механічною міцністю матеріалів та потенційною цитотоксичністю деяких компонентів.

Узагальнюючи вищенаведене, можна зазначити, що електропрядені нановолокна відкривають нові можливості в медицині, зокрема, в лікуванні ран і тканинній інженерії, що робить їх перспективними для подальших досліджень та розробок.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Виготовлення та дослідження мембран із хітозану методом електропрядіння

##### 2.1.1 Матеріали

Порошок хітозану низької молекулярної ваги (890 000 Да) був придбаний у компанії Glentham Life Sciences (Коршем, Велика Британія) CAS 9012-76-4. Всі інші реагенти – дихлорметан, DCM (CAS 75-09-2), трифтороцтова кислота, TFA (CAS 76-05-1),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (CAS 144-55-8) і NaOH (CAS 1310-73-2) – були придбані в компанії Sigma-Aldrich (Сент-Луїс, Міссурі, США).

##### 2.1.2 Підготовка розчинів для електропрядіння

Розчин хітозану 3,5 % було приготовлено шляхом розчинення порошку хітозану в TFA/DCM у відношенні об'єму 7:3 v/v (розчин 1) або 9:1 v/v (розчин 2) за магнітним перемішуванням упродовж ночі за кімнатної температури до утворення однорідного розчину (рис. 2.1 А). Електропрядіння отриманих розчинів проводили впродовж не більше ніж 12 годин після їх приготування. Перед електропрядінням розчини тримали за кімнатної температури в шприцах упродовж 30 хвилин для видалення повітряних пухирців.

##### 2.1.3 Виготовлення мембран методом електропрядіння

Система електропрядіння для підготовки волокнистих матеріалів складалася з шприц-насоса, джерела живлення постійного струму високої напруги та циліндричного обертового барабана, обмотаного алюмінієвою фольгою (діаметр – 30 мм, довжина – 120 мм) з контрольованою швидкістю обертання від 0 до 3 000 об/хв (рис. 2.1 Б).



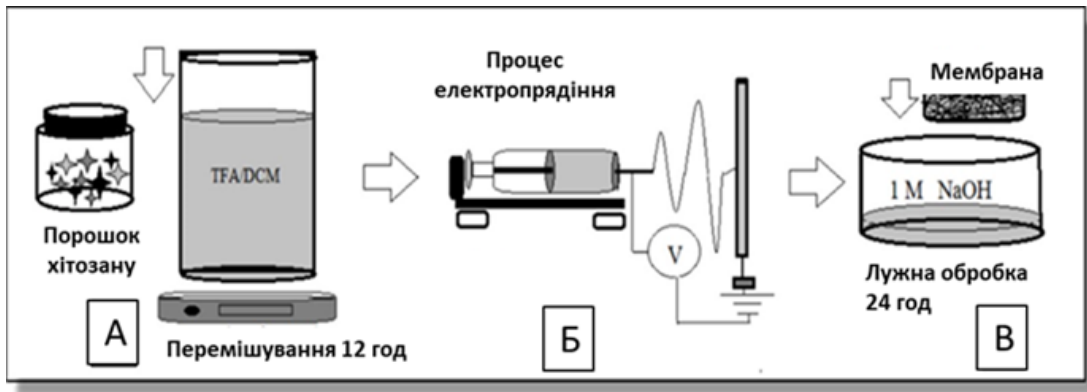


Рисунок 2.1 – Схеми підготовки зразків: підготовка розчину хітозану (А); процес електропрядіння (Б); лужне оброблення мембран хітозану (В)

Розчин хітозану був перенесений у 10-мілілітровий пластиковий шприц із металевою голкою (внутрішній діаметр 0,69 мм). Шприц-насос доставляв розчин хітозану до кінця голки зі швидкістю подачі 5,0 мл/год. Між двома електродами підтримували електричне поле 33 кВ. Швидкість обертання становила 1 000 об/хв. Колектор був розміщений на відстані 15 см від кінця голки. Електропрядіння відбувалося за відносної вологості 30–35 % і температури 23–25 °С. Мембрани з хітозану потім відокремлювали від колектора та висушували за кімнатної температури впродовж 12 годин.

#### 2.1.4 Нейтралізаційне оброблення нановолокнистих мембран

Щоб запобігти розчиненню нановолокнистих мембран хітозану у водяному середовищі, їх нейтралізували в різних натрієвих розчинах (NaOH і Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Оброблення проводили, нейтралізуюючи зразки в 1 М розчині NaOH та 1 М розчині Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (водному або 70 % спиртовому) в пластиковому 24-лунковому планшеті впродовж 24 годин (рис. 2.2. В).

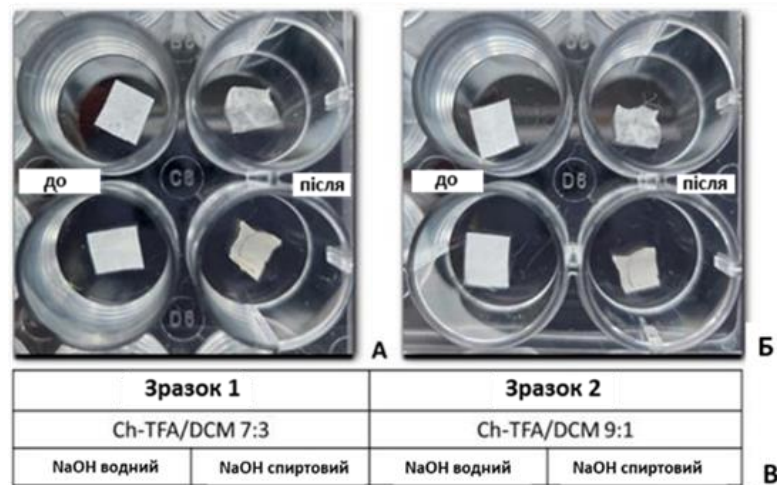


Рисунок 2.2 – Макроскопічне зображення мембран хітозану: зразок 1 (А) та зразок 2 (Б) до та після 24-годинного оброблення 1 М водним розчином NaOH (верхній ряд) та 1 М етаноловими розчинами NaOH (нижній ряд). Типи зразків, підготовлені для дослідження (В)

Після оброблення було отримано такі зразки: розчин 1 та розчин 2 з нейтралізацією водним NaOH і спиртово-водним NaOH відповідно й розчин 1 і розчин 2 з нейтралізацією водним  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  і спиртово-водним  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , відповідно.

### 2.1.5 Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є

Дослідження проводили за допомогою фур'є-спектрометра Thermo Nicolet Nexus 470 (Thermo Fisher Scientific, Волтгем, МА, США) в діапазоні від 4 000 до 500  $\text{cm}^{-1}$ . Піки аналізували за допомогою програмного забезпечення Origin (OriginPro, версія 9.5.1, Northampton, МА, США). Метод використовували для аналізування хімічної структури природного хітозану та біополімеру після оброблення. Для аналізування використовували 50 мг сухого зразка.

### 2.1.6 Сканувальна електронна мікроскопія (SEM)

Для оцінювання структури мембрани як до, так і після оброблення використовували сканувальний електронний мікроскоп (FEI, Брно, Чехія). Зразки з кожної електропряденої мембрани (5x5 мм), розміщені на металевій

підложці, були покриті вуглецевим шаром на вакуумній установці VUP-5M (SELMІ, Суми, Україна). Середній діаметр волокна, розподіл діаметрів волокна та пористість – "частка пористої області" – аналізували за допомогою програмного забезпечення для аналізування зображень (ImageJ 1.518j, Національний інститут здоров'я, Бетезда, Меріленд, США). "Частка пористої області" мембранного волокна була отримана шляхом визначення площі пор, поділеної на загальну площу дослідженої області зображення. "Частка пористої області" відповідає "локальній пористості" [131]. Усі параметри були отримані з п'яти SEM-зображень для 100 волокон для кожного типу дослідженої мембрани.

### 2.1.7 Дослідження показників деградації

Динаміка здатності до поглинання рідини мембранами з хітозану (15x15 мм) була визначена шляхом оцінювання різниці у вазі між набряковим станом у воді за нейтрального рН після 20 та 60 хвилин і кінцевою сухою вагою за кімнатної температури. Середнє значення трьох вимірювань вологих зразків і сухих зразків використовували для визначення коефіцієнта набряку за допомогою рівняння (1):

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

де  $W_s$  (г) – вага набряклої нановолокнистої мембрани;  $W_d$  (г) – вага зразків після висихання за кімнатної температури.

Відсоткову втрату маси зразків (15x15 мм) розраховували до та після занурення в PBS. Мембрани інкубували в PBS для імітації умов фізіологічної деградації. Зразки замочували у PBS (рН 7,4) протягом 1 дня, 3 днів, 1 тижня та 1 місяця. Потім зразки промивали дистильованою водою Milli-Q і висушували впродовж ночі за кімнатної температури для видалення поглиненої води. Вимірювання проводили в трьох повторах. Відсоткову втрату маси зразків після занурення розраховували за допомогою рівняння [132] (2):

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

де  $W_s$  (г) – вага набряклої нановолокнистої мембрани;  $W_d$  (г) – маса зразків після сушіння за кімнатної температури.

Для оцінювання деградації морфологію нановолоконних мембран досліджували за допомогою SEM. Після 1 місяця зразки були вийняті з розчину, промиті дистильованою водою й висушені за температури 25 °С. Мембрани були покриті сріблом і вивчені за допомогою SEM.

### **2.1.8 Дослідження токсичності та біосумісності на культурах клітин**

Для оцінювання біосумісності хітозанових мембран були проведені експерименти на культурах клітин. Людські епітеліальні клітини остеосаркоми кістки (лінія клітин U2OS) вирощували в культуральних планшетах (75 см<sup>2</sup>) за стандартних умов культивування з вологістю повітря, що містить 5 % вуглекислого газу (CO<sub>2</sub>) за температури 37 °С з оновленням середовища кожні 2–3 дні. Використовували модифіковане середовище DMEM/F-12 з L-глутаміном, що містить 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В і 10 % фетальної бичачої сироватки. Зразки (5 x 5 мм) були занурені в 70 % етанол на 30 хв для стерилізації, після цього проводили п'ятиразове промивання у PBS по 5 хв кожне для видалення залишкового етанолу. Потім зразки поміщали в 24-лунковий стерильний культуральний планшет із PBS на 12 годин. Наступного дня клітини U2OS засівали на зразки зі щільністю 1 x 10<sup>4</sup> клітин на лунку, після цього додавали живильне середовище. Через 24 години до кожної лунки додавали 10 мкл (10 % об'єму культивуемого середовища) розчину резазурину (0.15 мг/мл, рН 7.4). Планшети інкубували впродовж 4 годин за температури 37 °С у темряві. З кожної лунки було перенесено по 100 мкл середовища в інший 96-лунковий планшет. Поглинання вимірювали за допомогою планшетного спектрофотометра Multiskan FC (Thermo

Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) за довжини хвилі 570 і 600 нм. Аналіз редукції резазурину повторювали через 3 і 6 днів. Кожний зразок досліджували в трьох повторях. Після завершення досліджень зразки готували для дослідження SEM. Для SEM зразки промивали від середовища у PBS за кімнатної температури для видалення надлишкового білка. Для фіксації мембрани занурювали у 2,5 % глютаральдегід (у 0,1 М PBS) двічі на 40 хвилин, після цього промивали в PBS (двічі по 15 хвилин). Дегідратацію проводили, занурюючи зразки в зростаючі концентрації спирту (50 %, 70 %, 90 % та 96 %) на 30 хв для кожної концентрації. Після цього зразки занурювали у 96 % спирт на 12 годин.

### **2.1.9 Оцінювання антибактеріальної активності *in vitro***

Антибактеріальні властивості досліджували на грампозитивні бактерії, а саме *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, В 918), та грамнегативні бактерії, *Escherichia coli* (*E. coli*, В 926), отримані з Колекції бактерій Сумського державного університету Національною колекцією мікроорганізмів (Інститут мікробіології та вірусології НАН України, Київ, Україна). Культури інкубували за температури 37 °С протягом 24 годин. Потім були підготовлені бактеріальні суспензії в початковій концентрації  $10^5$  колонієутворювальних одиниць на один мілілітр (КУО/мл) у рідкому поживному середовищі Мюллера – Хінтона. Антимікробну дію волокон хітозану оцінювали відповідно до схеми проведення дослідження на антибактеріальну активність (рис. 2.3). Антибактеріальні властивості в динаміці визначали за допомогою динамічного контактного тесту. Здатність до інгібування формування біоплівки оцінювали за допомогою тесту на основі редукції резазурину. SEM зразків після 8-годинного інкубації в бактеріальній суспензії була проведена для оцінювання структури бактеріальної біоплівки. З метою стерилізації зразки площею 0,25 см<sup>2</sup> були розміщені в ламінарній шафі (Порса, Україна) під УФ-випромінюванням за довжини хвилі 254 нм протягом 30 хвилин. Тестування зразків були проведені в трикратному повторенні для обох видів бактерій. Експерименти проводили за постійних атмосферної температури, вологості та освітлення.



Рисунок 2.3 – Схема проведення дослідження на антибактеріальну активність

### 2.1.9.1 Дослідження антибактеріальних властивостей у динамічному контакті з бактеріальною культурою

Динамічний контактний тест використовували для визначення планктонної мікробної популяції шляхом розрахунку логарифмічного зменшення кількості бактеріальних клітин у бактеріальній суспензії. Зразки інкубували в стерильних плоскодонних 24-лункових пластикових планшетах з  $10^5$  КУО/мл бактерій 2 мл поживного бульйона протягом 2, 4, 6 та 8 годин за температури  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . В кожному часовому періоді 20 мкл суспензії інокулювали на живильний агар та інкубували за температури  $37\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 24 годин. Потім колонії підраховували та кількісно визначали як КУО/мл. Бактеріальну суспензію ( $10^5$  КУО/мл) використовували як контроль.

Коефіцієнт редукції (R) загальної кількості бактерій розраховували за допомогою такого рівняння (3):

$$R, \% = \frac{(C-E)}{C} \cdot 100, \quad (3)$$

де С і Е – кількість бактерій, які вижили (КУО/мл) в контрольній та експериментальній лунках відповідно.

### 2.1.9.2 Антиадгезивні властивості в тесті на відновлення резазурину

Дослідження ґрунтується на феномені метаболізації резазурину до резорурфіну бактеріями. Метод дозволяє оцінити динаміку кількості мікробних клітин у біоплівках шляхом виявлення їх метаболічної активності. Для цього після інкубації за температури 37 °С протягом 2, 4, 6 та 8 годин експериментальні (зразки в бактеріальній суспензії у початковій концентрації 10<sup>5</sup> КУО/мл) та контрольні (зразки в поживному бульйоні) промивали фосфатно-буферним розчином (PBS), переносили в 15-мл стерильні конічні пробірки з 10 мл PBS і піддавали обробленню ультразвуком протягом 1 хвилини за 1 200 об/хв. Після цього 100 мкл аліквоти з усіх експериментальних та контрольних пробірок переносили в 96-лункові пластикові планшети у трьох повторях. Потім додавали резазурин у кількості, що дорівнює 10 % об'єму контрольних і експериментальних лунок. Оптичну щільність резорурфіну, синтезованого мікробами, вимірювали за довжини хвилі 570 нм та 600 нм за допомогою планшетного спектрофотометра Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Волтгем, МА, США), обладнаного програмним забезпеченням SkanIt Software 4.1, протягом 60-хвилинних періодів інкубації за температури 37 °С. Для розрахунку відсоткової різниці (D) між експериментальними (E) та контрольними (C) лунками на основі оптичних показників використовували таку формулу, наведена виробником (4):

$$Difference, \% = \frac{((O2 \times A1) - (O1 \times A2))}{((O2 \times P1) - (O1 \times P2))} \times 100, \quad (4)$$

де  $O_1$  – молярний коефіцієнт екстинкції окисненого резазурину за 570 нм;  $O_2$  – молярний коефіцієнт екстинкції окисненого резазурину за 600 нм;  $E_1$  – значення поглинання експериментальних лунок за 570 нм;  $E_2$  – значення поглинання експериментальних лунок за 600 нм;  $C_1$  – значення поглинання контрольних лунок за 570 нм;  $C_2$  – значення поглинання контрольних лунок за 600 нм.

### **2.1.9.3 Вивчення морфології бактеріальної біоплівки за допомогою SEM**

Після 8 годин коінкубації в бактеріальних суспензіях (2 мл суспензії з концентрацією  $10^5$  КУО/мл) електропрядені мембрани промивали тричі PBS і фіксували в 2,5 % розчині глутаральдегіду протягом 30 хвилин двічі. Після цього електропрядені мембрани промивали з PBS і поступово дегідратовували у зростаючій концентрації етанолу (від 40 % до 96 %) протягом 30 хвилин для кожної концентрації та висушували за кімнатної температури протягом 12 годин. Фіксовані зразки були покриті напиленням срібла (VUP-5M, SELMI, Суми, Україна) та вивчені за допомогою SEM для дослідження морфологічних характеристик бактерій.

## **2.2 Виготовлення та дослідження мембран із хітозану та полімолочної кислоти методом електропрядіння**

### **2.2.1 Матеріали**

Порошок низькомолекулярного хітозану (890 000 Да) був придбаний у Glentham Life Sciences (Коршем, Великобританія), CAS 9012-76-4, розчин оцтової кислоти (1,0 M), CAS 7732-18-5, був отриманий від Honeywell (Шарлотта, Північна Кароліна, США). Всі інші реагенти – порошок полі(L-лактиду) (середня  $M_n$  40 000), CAS 26161-42-2, порошок полі(етиленоксиду) (середня  $M_v$  ~300 000), CAS 25322-68-3, поліетиленгліколь (MW 1500), CAS 25322-68-3, хлороформ ( $\geq 99$  %), CAS 67-66-3, етиловий спирт ( $\geq 99,8$  %), CAS 64-17-5 та NaOH (CAS 1310-73-2) - були придбані у Sigma-AldriCh (Сент-Луїс, штат Мічиган, США).



### 2.2.2 Підготовка розчинів для електропрядіння

Десять мілілітрів 99,9 % оцтової кислоти, яка була попередньо розчинена в дистильованій воді до кінцевої концентрації 50 % та об'єму 20 мл, й 1,6 г порошку хітозану (Ch) змішували, потім додавали 1,6 г поліетиленоксиду (PEO) та перемішували [133]. 0,2 г полімолочної кислоти (PLA) розчиняли у 5 мл хлороформу, після чого надлишок хлороформу видаляли. Після цього розчин Ch був змішаний із розчиненою PLA, щоб отримати розчин 1 [134]. Інший зразок (розчин 2) отримували додаванням PEG (1,2 г) до розчину, приготованого відповідно до розчину 1. Схема отримання розчинів полімерів (рис. 2.4).

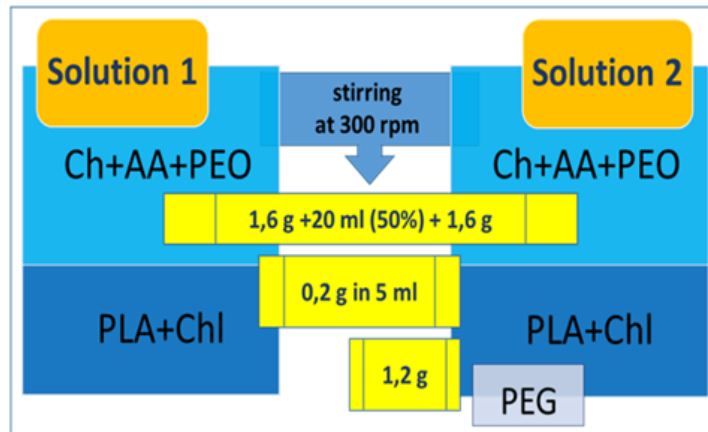


Рисунок 2.4 – Полімери для електропрядіння: приготування розчинів Ch/PLA та Ch/PLA-PEG

### 2.2.3 Виготовлення мембран методом електропрядіння

Шприц об'ємом 50 мл (внутрішній діаметр голки 0,69 мм) заповнювали розчином полімеру. Відстань голка-колектор становила 15 см, швидкість подачі розчину – 1,5 мл/год, прикладена напруга – 25 кВ. Процес електропрядіння відбувався за вологості менше 35 % і температури 21–23 °С. Отримані зразки збирали на електропрядильному циліндричному колекторі діаметром 3 см. Зразки сушили за кімнатної температури для видалення залишків розчинника впродовж 12 годин.

## 2.2.4 Нейтралізаційне оброблення нановолокнистих мембран

Мембрани Ch/PLA обробляли 1 М розчином гідроксиду натрію (NaOH), щоб зменшити їх високий ступінь розчинності та захистити нановолокнисту структуру. Обидва типи мембран (1 – Ch/PLA і 2 – Ch/PLA-PEG) нейтралізували лужним розчином 1 М NaOH (70 % етанол / 30 % водний розчин) протягом 12 годин, повторно промивали дистильованою водою й сушили впродовж 12 годин за кімнатної температури (рис. 2.5).

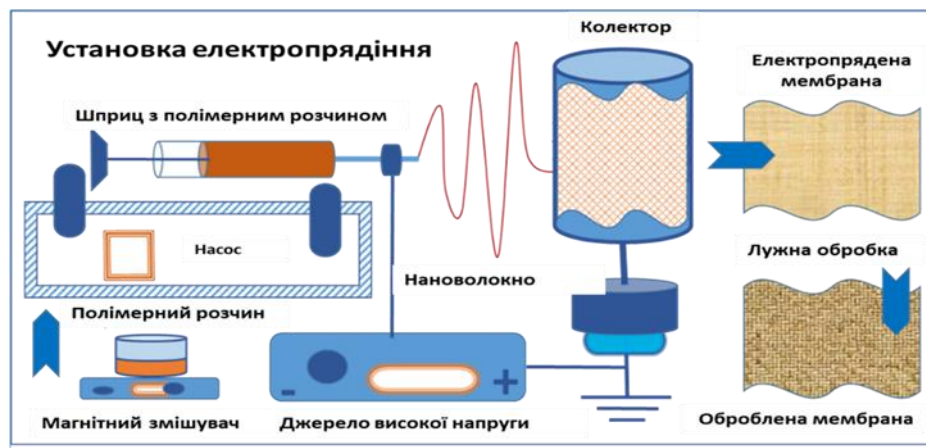


Рисунок 2.5 – Схематичне зображення процесу виготовлення та оброблення нановолокнистих мембран методом електропрядіння

## 2.2.5 Сканувальна електронна мікроскопія (SEM)

Структуру електропрядених волокон, прикріплення клітин та бактеріальну колонізацію спостерігали за допомогою SEO-SEM Inspect S50-B (FEI, Брно, Чехія). Діаметр волокна та «локальну пористість» вимірювали за допомогою програмного забезпечення Fiji (ImageJ 1.51f; Java 1.8.0\_102). «Частку пористої площі» визначали за допомогою комп'ютерного бінарного аналізування зображень. Зображення були сегментовані на чорні (пористі) та білі (субстрат) області з використанням порогового рівня сірого [135]. «Частка пористої поверхні» визначалася шляхом ділення площі пор на загальну площу досліджуваної області зображення. «Частка пористої площі» безпосередньо відповідає «локальній пористості». Частотні гістограми розподілу діаметрів волокон будували за допомогою програми Excel (Office 365 ProPlus).

### **2.2.6 Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є**

З метою вивчення молекулярних взаємодій волокна Ch/PLA були охарактеризовані за допомогою інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (ІЧ-спектроскопія, Фур'є). Для експериментів використовували ІЧ-спектрометр Thermo Nicolet Nexus 470 FT-IR, оснащений адаптером ATR.

### **2.2.7 Дослідження показників деградації**

Втрату маси зразків (1,0x1,0 см) визначали до та після занурення в PBS. Ch/PLA мембрани замочували в PBS (рН 7,4) на термін до 16 тижнів. У кожній часовій точці зразки промивали водою Milli-Q і висушували протягом 12 годин за кімнатної температури для видалення поглиненої води. Для розрахунку відсотка втрати маси використовували рівняння (2), подане в розділі 2.1.7.

### **2.2.8 Характеристика змочуваності поверхні**

Гідрофільність поверхні мембрани контролювали шляхом вимірювання величини контактного кута [136] за допомогою оптичного приладу для вимірювання контактного кута (OCA 15 EC, Data Physics, США), що базується на відеозйомці. Значення кута контакту реєстрували для надчистої води Milli-Q щонайменше для трьох паралельних вимірювань.

### **2.2.9 Дослідження токсичності та біосумісності на культурах клітин**

Для оцінювання біосумісності та цитотоксичності мембран використовували культуру клітин меланоми мишей B16F10. Матеріали стерилізували зануренням у 80 % етанол і витримували під УФ-світлом протягом 1 години. Для видалення залишків етанолу мембрани тричі промивали у фосфатно-буферному розчині (PBS) протягом п'яти хвилин. Зразки поміщали в 6-лункові планшети для культивування клітин і занурювали в живильне середовище на 12 годин. Клітини меланоми мишей B16F10 культивували в культуральних планшетах площею 25 см<sup>2</sup> за стандартних умов зволоженого повітря, що містить 5 % CO<sub>2</sub>, за температури 37 °C. Використовували модифіковане середовище DMEM/F-12 з

L-глутаміном, що містить 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В та 10 % фетальної бичачої сироватки. Клітини висівали на мембрани з щільністю  $10^4$  клітин/см<sup>2</sup>. Лунки, що містили лише клітини, слугували позитивним контролем, а ті, що містили лише середовище, – негативним контролем. Тест був проведений у трикратному повторенні.

Для оцінювання загальної метаболічної активності клітин на 1-шу, 3-тю та 5-ту доби використовували колориметричний аналіз із застосуванням резазурину. У кожен лунку додавали резаурин (Sigma-Aldrich, США) кількістю, що дорівнює 10 % від об'єму середовища. Планшети інкубували протягом 8 годин за температури 37 °С в інкубаторі. У стерильні 96-лункові планшети переносили по 100 мкл середовища з кожної лунки. Поглинання вимірювали за допомогою мікропланшетного спектрофотометра Multiskan SkyHigh plate reader за довжин хвиль 570 і 600 нм. Результати імпортували в Microsoft Excel для подальшого оцінювання.

#### **2.2.10 Оцінювання антибактеріальної активності *in vitro***

Для дослідження антимікробної активності нановолокнистих мембран Ch/PLA з додаванням та без додавання PEG були використані штами *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, В 918), та грамнегативної бактерії, *Escherichia coli* (*E. coli*, В 926), отримані з Національної колекції мікроорганізмів (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного, Україна). Мікробні культури культивували в бульйоні за температури 37 °С протягом 24 годин. Зразки площею 0,5 см<sup>2</sup> (для аналізування росту та життєздатності бактерій у динамічному спостереженні) і диски діаметром 5 мм (для аналізування диско-дифузійним методом) були використані для дослідження. Для бактеріологічних експериментів зразки були знезаражені шляхом замочування в 70 % етанолі на 10 хвилин, потім двічі промиті в стерильній воді та поміщені під УФ-світло (при 254 нм) на 30 хвилин.

### **2.2.10.1 Дослідження антибактеріальних властивостей у динамічному контакті з бактеріальною культурою**

Зразки мембран розкладали в стерильний 24-лунковий пластиковий планшет із 2 мл попередньо підготовленого бактеріального бульйону ( $10^5$  КУО/мл). Контролем слугували добові культури бактерії, суспендовані в поживному бульйоні. Після інкубації протягом 2, 4, 6 і 8 годин на чашки Петрі з живильним середовищем висівали аліквоти по 10 мкл з кожної лунки, а потім інкубували за температури 37 °С протягом 24 годин для подальшого підрахунку кількості бактеріальних колоній. Антимікробну активність оцінювали розраховуючи швидкість бактеріальної редукції (R) за рівнянням (3), наведеним у підрозділі 2.1.9.1.

### **2.2.10.2 Дискодифузійний метод**

П'ятдесят мкл бактеріального бульйону ( $10^8$  КУО/мл) наносили на чашки Петрі із щільним живильним середовищем. Диски з нановолокнистих мембран розміщували на поверхні агару. Чашки інкубували в перевернутому стані за температури 37 °С. Діаметр зони інгібування вимірювали через 24 години, включаючи діаметр диска. Позитивним контролем був диск із цефотаксимом.

### **2.2.10.3 Вивчення морфології бактеріальної біоплівки**

Зразки були досліджені методом SEM для вивчення прикріплення та проліферації бактеріальних штамів на поверхні волокон із подальшим формуванням біоплівок у тривимірній структурі скафолдів після 24 годин спільної інкубації. Підготовка зразків для SEM була аналогічною до описаної раніше.

## **2.3 Виготовлення та дослідження електропрядених мембран із хітозану та полімолочної кислоти, навантажених наночастинками срібла**

### **2.3.1 Навантаження нановолокнистих Ch/PLA мембран наночастинками срібла (AgNPs)**

Ch/PLA нановолокнисті мембрани, виготовлені та оброблені лугом як було описано в підрозділах 2.2.1–2.2.4, були навантажені наночастинками срібла (AgNPs, Nano Pure Co., Польща). Ці AgNPs синтезували в сталевому УФ-реакторі та фільтрували за допомогою мембрани за методом оберненого осмосу. Характеризуючись сферичною морфологією, AgNPs, використані в цьому дослідженні, мали середній розмір  $27 \pm 4,3$  нм [137]. Введення AgNPs в мембрану Ch/PLA досягалося шляхом нанесення 10 мкл розчину наночастинок срібла на зразки розміром 1 см x 1 см за різних концентрацій: 12,5 мкг/мл, 25, 50, 100, 200 та 400 мкг/мл. Після нанесення AgNPs зразки висушували протягом 24 годин за кімнатної температури.

### **2.3.2 Сканувальна електронна мікроскопія (SEM) та рентгенівська енергодисперсійна спектроскопія (EDX)**

Дослідження проводили з використанням сканувального електронного мікроскопа SEO-SEM Inspect S50-B (FEI, Брно, Чехія) з напругою прискорення 15 кВ, обладнаного рентгенівським спектрометром з енергодисперсійною детекторною системою (AZtec One з X-MaxN20, Oxford Instruments plc, Абінгдон, Велика Британія), для оцінювання морфологічних особливостей нановолокон та колонізації бактеріями мембран. Переріз зразків був отриманий шляхом їх розрізання. Мембрани були закріплені за допомогою тримача для зразків EM-Tec S-Clip з 1xS-Clip під кутом  $90^\circ$  до електронного променя. Діаметр волокон та орієнтація волокон і пористість мембран були виміряні за допомогою програмного забезпечення Fiji (ImageJ 1.51f; Java 1.8.0\_102) [138]. Для оцінювання орієнтації волокон використовували програму ImageJ, яка генерувала кольорову карту. Локальний кут орієнтації розташовували в діапазоні від  $-90^\circ$  до  $90^\circ$  відносно горизонтальної осі. «Частку пористої площі» визначали

за допомогою комп'ютерного бінарного аналізування зображень. Це включало сегментацію зображень на чорні (пористі) та білі (основа) області за допомогою порогового оброблення сірого рівня. Частку пористої площі обчислювали як співвідношення площі пор до загальної дослідженої площі. Середні значення діаметрів волокон та «частка пористої площі» були вираховані разом із їх стандартними відхиленнями. Перед аналізом зразки були покриті золотим напиленням, щоб зробити їх електропровідними.

### **2.3.3 Характеристика змочуваності поверхні**

Вимірювання контактного кута (КК) між твердою поверхнею та тангентною до вологого агента виконували за допомогою оптичного контактного кутового вимірювального приладу на основі відео (OCA 15 EC, Data Physics, Сант-Ріверсайд, Каліфорнія, США). Значення КК фіксували для води Milli-Q в ультрарозчиненому стані за допомогою щонайменше трьох паралельних вимірів. Об'єм краплі був установлений на рівні 5 мкл. Після того як крапля рідини падала на електророзпилену мембрану, пряму лінію визначали як точку, що відповідає контактній точці між твердою, рідкою та повітряною фазами. Значення вологості визначали таким чином: супергідрофобність дорівнює  $0^\circ < \theta < 10$ .

### **2.3.4 Дослідження вивільнення іонів срібла з нановолокон модифікованих мембран**

Попередньо підготовлені нановолокнисті мембрани Ch/PCL, функціоналізовані AgNPs (розділ 2.3.1), були занурені в 50 мл деіонізованої води для досліджень вивільнення іонів срібла. Зразки цього розчину відбирали через регулярні проміжки часу за 1, 3, 6, 14 і 24 години. Концентрацію Ag у зібраних зразках вимірювали за допомогою мас-спектрометрії з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP-MS).

Щоб підготувати зразки для аналізу, кожний зразок пройшов підкиснення азотною кислотою (TraceMetal™ Grade, Fisher Chemical™) до досягнення кінцевої концентрації 2 % (об/об). Згодом підкиснені зразки вводили для

аналізування в прилад Agilent 8900 ICP-MS QQQ, оснащений розпилювачем Micro-mist.

Щоб забезпечити точність, була застосована корекція холостого зразка, а реагенти Ultraclean (TraceMetal™ Grade, Fisher Chemical™) разом із відповідними холостими пробами були використані для моніторингу та виправлення будь-якого потенційного фонового забруднення. Стабільність системи під час вимірювань контролювали за допомогою розчину внутрішнього стандарту (10 мкг L<sup>-1</sup>), Agilent). Крім того, через кожні десять зразків аналізували два стандартні розчини (10 мкг L<sup>-1</sup>), щоб підтвердити стабільність системи та перевірити точність результатів.

Оброблення, збирання та обчислення результатів проводили за допомогою програми Mas-sHunter Workstation, яка включала підпрограми для керування приладом й автономного аналізування даних.

### **2.3.5 Дослідження токсичності та біосумісності на культурах клітин**

Для оцінювання цитотоксичності та біосумісності електропрядених мембран Ch/PLA з різними концентраціями AgNPs використовували культуру стовбурових клітин мезенхімального пуповинного походження (UC MSC). П'ятисантиметровий відрізок людської пуповини був отриманий із Сумського обласного клінічного перинатального центру після нормальних пологів за попередньою згодою батьків, щоб видобути MSC. Це було зроблено відповідно до етичного дозволу, наданого Інституційною комісією з біоетики експериментальних та клінічних досліджень Навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету. Щоб дозволити необхідним білкам прикріпитися до поверхні мембран, мембрани поміщали у 24-лунковий планшет, заповнений середовищем DMEM/F12 з 10 % бичачою сироваткою, 100 одиниць пеніциліну, 100 одиниць стрептоміцину та 0,25 мг амфотерицину В на мл (комплексне середовище) в вологій атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub> за температури 37 °C і культивували протягом 12 годин у стандартних умовах інкубатора для клітинних культур. Наступного дня до кожного планшета з UC MSC, засіяного з



густотою 10 000 клітин/см<sup>2</sup> (або 34 000 клітин на лунку), додавали 1 мл середовища. Як позитивні та негативні контролю використовували лунки, що містили лише клітини в середовищі, та лунки, що містили лише середовище.

Цитотоксичність оцінювали за допомогою аналізування відновлення резазурину, як описано в попередніх розділах. Цей аналіз вимірює метаболічну активність культивованих клітин. Для цього до лунок додавали 15 мкг/мл резазурину, а потім клітини інкубували протягом 8 годин у стандартних умовах. Після цього 100 мкл середовища переносили до іншого 96-лункового планшета та оптичну щільність вимірювали за 570 та 600 нм за допомогою планшетного спектрофотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific). Для кількісного визначення результатів використовували формулу для вимірювання цитотоксичності або проліферації за допомогою AlamarBlue спектрофотометрії (BioRad Laboratories).

### **2.3.6 Оцінювання антибактеріальної активності *in vitro***

*E. coli* (ATCC 25922) та *S. aureus* (ATCC 25923) були обрані для оцінювання антимікробної ефективності мембран Ch/PLA. Бактеріальні штами культивували в поживному бульйоні за температури 37 °C протягом 24 годин. Для тестів використовували зразки (0,5 см<sup>2</sup>). Перед експериментом усі зразки проходили стерилізацію за допомогою ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі 254 нм протягом 30 хвилин із кожного боку для забезпечення стерильності та усунення будь-яких потенційних забруднень. Експерименти проводили в трьох повторах.

#### **2.3.6.1 Дослідження антибактеріальних властивостей у динамічному контакті з бактеріальною культурою**

Тестові мембрани на основі Ch/PLA та з різними концентраціями AgNPs оцінювали на наявність антимікробної активності. Контрольний зразок (мембрани, не навантажені наночастинками) та тестові мембрани були поміщені у 96-лункові планшети, що містили 200 мкл добових культур *S. aureus* та *E. coli*

( $10^5$  КУО/мл) протягом 24 годин за температури 37 °С. Стерильний бульйон слугував негативним контролем, а бактеріальний бульйон – позитивним контролем. Для аналізування відновлення резазурину використовували об'ємний відсоток 10 % комерційно доступного розчину резазурину (Sigma-Aldrich, США). Розчин додавали до кожної лунки через 2, 4, 6 і 24 години після співкультивування зразків із бактеріальною суспензією, абсорбцію вимірювали за довжини хвилі 570 нм та 600 нм за допомогою мікропланшетного спектрофотометра Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, Волтем, Массачусетс, США) після 4-годинної інкубації. Відсоток редукції резазурину обчислювали за формулою виробника [139].

#### **2.3.6.2 Антиадгезивні властивості методом посіву на живильний агар**

Зразки піддавали інкубації в бактеріальному бульйоні за температури 37 °С упродовж 2, 4, 6 та 24 годин. Після цього зразки промивали тричі стерильним розчином хлориду натрію для видалення неприкріплених клітин. Для видалення бактерій, які прилипли до поверхні зразків, використовували ультразвукову ванну (модель В3500S-МТ, Branson Ultrasonics Co., Шанхай, Китай), де зразки обробляли в пробірках, що містили 1,0 мл стерильного фізіологічного розчину протягом 1 хвилини. Після ультразвукового оброблення 10 мкл суспензії переносили на живильні щільні середовища для кількісного визначення кількості бактерій після 24 годин інкубації за температури 37 °С. Також були досліджені контрольні зразки, що містили поживний бульйон без бактеріального інокуляційного матеріалу.

#### **2.3.6.3 Вивчення морфології бактеріальної біоплівки за допомогою SEM**

Після 24 годин інкубації в бактеріальній суспензії додаткову групу зразків піддавали підготовці для сканувальної електронної мікроскопії (SEM) з метою оцінювання прикріплення, колонізації та морфології бактерій на нановолокнах за раніше описаним методом.

## **2.4. Експериментальне дослідження на лабораторних тваринах**

### **2.4.1 Матеріали**

У експерименті використовували 54 лабораторних білих нелінійних лабораторних щурів-самців масою 200–240 г з віварію Сумського державного університету. Тварин утримували в чистих пластикових клітках із нержавіючими сталевими решітками за температури  $22 \pm 2$  °С у 12-годинному циклі світло / темрява. Їх годували стандартним збалансованим гранульованим кормом, адаптованим для щурів, і давали питну воду. Утримання, годування, поводження з тваринами та всі експерименти проводили відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986р.), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Етичних принципів та вказівок для експериментів на тваринах: 3-тє видання» (Швейцарія, 2005 р.) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013р.). Всі процедури, що проводили в дослідженні, затверджені висновком комісії Сумського державного університету з питань додержання біоетики під час проведення експериментальних та клінічних досліджень (протокол № 2/04 від 9 квітня 2024 р.).

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, В 918), *Escherichia coli* (*E. coli*, В 926) та *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, 2843) були отримані з Колекції бактерій Сумського державного університету Національною колекцією мікроорганізмів (Інститут мікробіології та вірусології НАН України, Київ, Україна).

В експерименті були використані мембрани, які були виготовлені методом електропрядіння, описаним у підрозділах 2.2.1–2.2.4, також були використані зразки Ch/PLA, модифіковані AgNPs у концентрації 100 мкг/мл за методом, описаним у підрозділі 2.3.1. Контрольна мембрана PLA була оброблена фармацевтичним розчином хлоргексидину (10 мкл на зразок).

#### 2.4.2 Дизайн експерименту на тваринах

Для загальної анестезії використовували в/м наркоз – розчин проседану (0,05 мл/кг). Лабораторних тварин голили в міжлопатковій ділянці та фіксували за кінцівки до предметного столика. Операційне поле тричі обробляли 70 % розчином етилового спирту та обкладали стерильними серветками. Стерильним скальпелем робили рановий дефект прямокутної форми в міжлопатковій зоні, розсікаючи шкіру та підшкірну клітковину, розмірами 1,0 см × 1,5 см ( $S = 1,5 \text{ см}^2$ ). Краї рани фіксували затискачами Кохера і в рану підшивали марлевий тампон (складений марлевий бинт 5 см × 10 см), змочений сумішшю добових культур мікроорганізмів *S. aureus* (1,0 мл), *E. coli* (1,0 мл) та *P. aeruginosa* (1,0 мл) з концентрацією кожного по  $5 \times 10^9$  КУО/мл. Колонії були взяті з добових культур і суспендовані в 5 мл стерильного фізіологічного розчину. Марлевий тампон видаляли через 72 години і підтверджували наявність ознак гнійного запалення (гіперемія шкіри, набряк тканин та виділення гною з неприємним запахом) (рис.2.6).

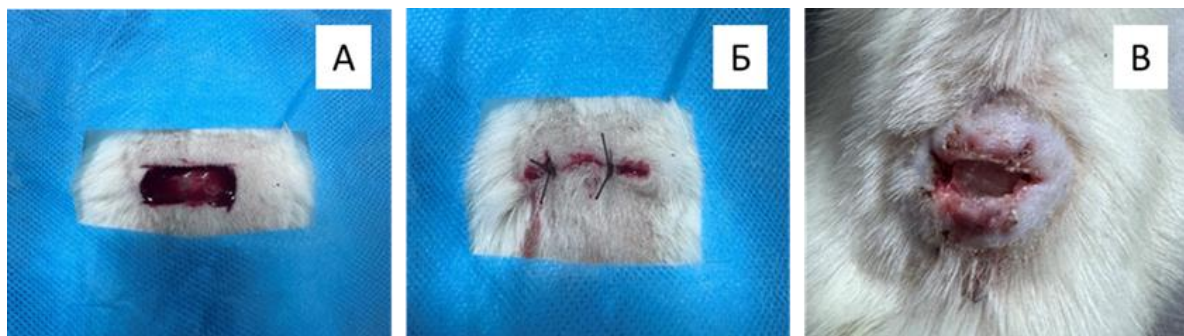


Рисунок 2.6 – Деталі експерименту: формування рани (А) введенням марлевого тампона з бактеріальною суспензією в глибокий шар шкіри; зашита рана (Б); формування гнійної рани через три дні від завдання рани (В)

Усі тварини були випадковим чином поділені на три групи з різними моделями лікування ран:

- (1) Ch/PLA мембрана (18 щурів);
- (2) Ch/PLA з AgNPs (18 щурів);
- (3) контрольна мембрана Ch/PLA з хлоргексидином (18 щурів).

Вищезазначені зразки 1,0 см x 1,5 см розміщували на рані, після цього накладали стерильну марлеву пов'язку. Щоденне перев'язування проводили в асептичних умовах відповідно до основних принципів гнійної хірургії. Лікування ран проводили на першій і другій стадіях ранового процесу. Тварин виводили з експерименту шляхом передозування анестезії (проседан, 0,15 мл/кг маси тіла тварини) на 3, 10 і 21-й дні після лікування. Зразки шкіри брали для подальшого гістологічного оцінювання.

#### **2.4.3 Планіметричне дослідження ранових поверхонь**

Ранові дефекти фотографували з 1-ї до 7-ї доби щоденно, надалі на 9-й, 11-й, 13-й, 15-й, 17-й, 11-й та 21-й дні експерименту фотокамерою Canon EOS 600D. Для підрахунку площі ранових поверхонь використовували їх цифрове зображення разом із заданим еталоном-лінійкою (градація 1 мм). Щоденний моніторинг зменшення дефекту рани проводили для оцінювання розміру рани. Площу дефектів рани розраховували за допомогою програмного забезпечення з відкритим доступом ImageJ© (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide>).

#### **2.4.4 Мікробіологічне дослідження ранового ексудату**

Кількісне та якісне дослідження мікробного забруднення рани проводили методом поверхневого забору мазків ексудату з рани. Перший зразок був взятий на 1-й день після моделювання гнійної рани, наступні зразки збирали на 3-й, 5-й, 7-й, 9-й, 11-й і 14-й дні експерименту. Зразки з центральної та периферичної частин ран збирали за допомогою стерильного ватного тампона для подальшого мікробіологічного аналізу. Всі зразки засівали на селективні агарні середовища за методом Голда. Всі живильні середовища виробництва Condalab, Іспанія, були придбані в компанії Хімлаборреактив, Україна (живильний агар МакКонкі №1052, поживний бульйон МакКонкі №1210, манітол-сольовий агар №1372 і цетримідний агар №1102). Засіяні чашки інкубували за температури 37 °С протягом 24 годин. Потім підраховували кількість колоній та виражали в логарифмічних значеннях.

#### 2.4.5 Гістологічне та імуногістохімічне дослідження

Для описування гістологічної картини було проведене гістологічне та імуногістохімічне дослідження тканин шкіри щурів, які отримували різний вид лікування модельованих гнійних ран.

Тканина ранової ділянки фіксувалася в 10 % нейтральному формаліні протягом 24 годин із подальшим виготовленням парафінових блоків. Серійні зрізи товщиною 5–6 мкм виконували на ротаційному мікротомі Shandon Finesse 325 (Thermo Scientific). Після проведеної депарафінізації та регідратації зрізи були пофарбовані розчином гематоксиліну (протягом 5 хвилин), потім – 1 % кислотним етанолом із подальшим промиванням дистильованою водою. Далі зрізи фарбували розчином еозину (протягом 3 хвилин) з подальшим етапним зневодненням спиртом та очищенням у ксилолі. Предметні скельця досліджували й фотографували за допомогою мікроскопа Carl Zeiss Primostar.

Для імуногістохімічного дослідження (ІГХ) з гістологічних парафінових блоків виготовляли серійні зрізи товщиною 4–5 мкм та розміщували на адгезивні скельця SuperFrost (Thermo Scientific) з подальшим висушуванням за температури 37 °C протягом 18 годин. Депарафінізованим зрізам проводили демаскування антигенів термічним методом шляхом їх нагрівання в цитратному буфері (pH 6,0) за температури 95–98 °C. Для візуалізації результатів ІГХ була використана система детекції «UltraVision Quanto Detection System HRP Polymer» (Thermo Scientific) – блокування ендogenous пероксидазної активності 3 % перекисом водню, блокування неспецифічного фонового фарбування з використанням «Ultra V Block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto». Як хромоген був використаний діамінобензидин (DAB). У таблиці 2.1 подана використана в дослідженнях панель антитіл («Thermo scientific», США та «Master-Diagnostica», Іспанія).

Таблиця 2.1 – Панель антитіл для ІГХ-дослідження

Антитіло	Імунізована тварина	Клон	Розведення	Локалізація в клітині
CD 68	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма та мембрана
MPO	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма
CD 163	Кролик	Моноклон клон (EP 324)	1:400	Цитоплазма та мембрана

Імуногістохімічна реакція під час дослідження тканин шкіри була оцінена за допомогою підрахунку позитивно забарвлених клітин у полі зору діаметром 1 000 мкм із застосуванням морфометричної програми «SEO Scan Lab 2.0» та «Zeiss Zen 2.0». Для контролю якості ІГХ-дослідження проводили активний (із використанням тканини, з попередньо доведеною позитивною та негативною реакцією) та пасивний контроль одержаних результатів.

## 2.5 Статистичний аналіз

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного пакета GraphPad Prism 9.1.1. Застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) для визначення достовірності відмінностей між трьома та більше групами. Для визначення достовірності відмінностей між двома групами використовували параметричний критерій Стьюдента (t). Перевірку величин на нормальність розподілу проводили із застосуванням критерію Колмогорова – Смірнова. Усі дослідження проводили в трьох повторах. Результати виражали у вигляді середнього значення  $\pm$  стандартної похибки. Статистично значущими вважали відмінності за  $p < 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1 Результати дослідження електропрядених мембран із хітозану

##### 3.1.1 Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є

Фур'є-трансформаційну інфрачервону спектроскопію (ФТ-ІЧ) використовували для оцінювання хімічних модифікацій ланцюгів хітозану через розчинення у TFA/DCM та подальшу нейтралізацію. ФТ-ІЧ-спектри нанесені й після оброблення зразків (рис. 3.1). Характерні поглинання хітозану спостерігаються при 616, 664 та 897  $\text{cm}^{-1}$ , що відповідає виходу за площину O-H, виходу за площину N-H та розтягуванню піранозного кільця відповідно. Наявність трьох поглинань приблизно в діапазоні 720–840  $\text{cm}^{-1}$  може свідчити про наявність ТФА в нановолокнах хітозану [140]. Поглинання хітозанової мембрани спостерігаються при 1 530 та 1 667  $\text{cm}^{-1}$  і відповідають розтягуванню протонуваних аміногруп ( $-\text{NH}_3^+$ ). Пік амідів I при 1 654  $\text{cm}^{-1}$  пов'язаний із вигином поза площиною вібрації групи C = O. Різкий пік низької інтенсивності при 1 550  $\text{cm}^{-1}$  приписується піку амідів II, де перекриваються вигини в площині N-H та розтягування зв'язку C-N. Пік амідів III при 1 386  $\text{cm}^{-1}$  пов'язаний із перекриттям вигину в площині зв'язку N-H та розтягування зв'язку C-N.

Симетричні та асиметричні розтягування  $\text{CH}_2$  видно при 2 886  $\text{cm}^{-1}$ , що відповідає розтягуванню зв'язку C-H у піранозному кільці. Пік при 903  $\text{cm}^{-1}$  є характерним для розтягування зв'язків C-O-C у глюкозаміновому кільці та виходу за площину зв'язку сахаридного кільця. Поглинання при 1 035–1 080  $\text{cm}^{-1}$  та 1 120–1 200  $\text{cm}^{-1}$  відповідають розтягуванню зв'язку C-OH та асиметричній вигину в площині зв'язку C-O-C відповідно [141].

Абсорбційні піки на позначення Ch відповідають розтягуванню симетричного витягування  $\text{CH}_3$  та витягуванню N-H/O-H з площини коливання, відповідно [142]. Нейтралізація зразків змінила електронну структуру мембран хітозану, підготовлених за допомогою розчину 1 або 2. Після постоброблення CS-волокон розчинами  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -етанол або NaOH-етанол, отриманими з розчину 2 (рис. 3.1 Б) або розчину 1 (рис. 3.1 А), спостерігається пригнічення піків у



діапазоні  $600\text{--}900\text{ см}^{-1}$  (витягування N-H з площини та розтягування піранозного кільця),  $1\ 000\text{--}1\ 060\text{ см}^{-1}$  (витягування C-OH),  $1\ 120\text{--}1\ 200\text{ см}^{-1}$  (асиметричне вигинання C-O-C),  $1\ 530$  та  $1\ 667\text{ см}^{-1}$  (розтягування протонуваних аміногруп [-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>]). Тим часом після постоброблення Ch-волокон, отриманих із розчину 2 та оброблених Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, всі піки незмінні (рис. 3.1 Б). Після постоброблення Ch-волокон, отриманих із розчину 1, пригнічуються піки при  $616$ ,  $664$  та  $897\text{ см}^{-1}$ , що відповідають виходу за площину O-H, виходу за площину N-H та розтягуванню піранозного кільця відповідно. Пік амідів I при  $1\ 654\text{ см}^{-1}$  також пригнічується (рис. 3.1 А). Аналізування спектрів ФТ-ІЧ після постоброблення Ch волокон, отриманих із розчину 2 (рис. 3.1, Б) та розчину 1 (рис. 3.1, А) з нейтралізацією у водному розчині NaOH, показує пригнічення піків у діапазоні  $600\text{--}900\text{ см}^{-1}$  (виходу за площину O-H, виходу за площину N-H та розтягування піранозного кільця). Абсорбційні піки при  $1\ 530$  та  $1\ 667\text{ см}^{-1}$ , що відповідають розтягуванню протонуваних аміногруп (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), також пригнічуються. Інтенсивність зазначених піків зменшується для розчину 1. Зазначені оброблення видаляють сліди ТФА, зменшують концентрацію NH<sub>3</sub><sup>+</sup> та змінюють розтягувальні режими вібрацій C-C, C-O та C-OH. Після постоброблення залишаються симетричне витягування CH<sub>3</sub> та витягування N-H/O-H.

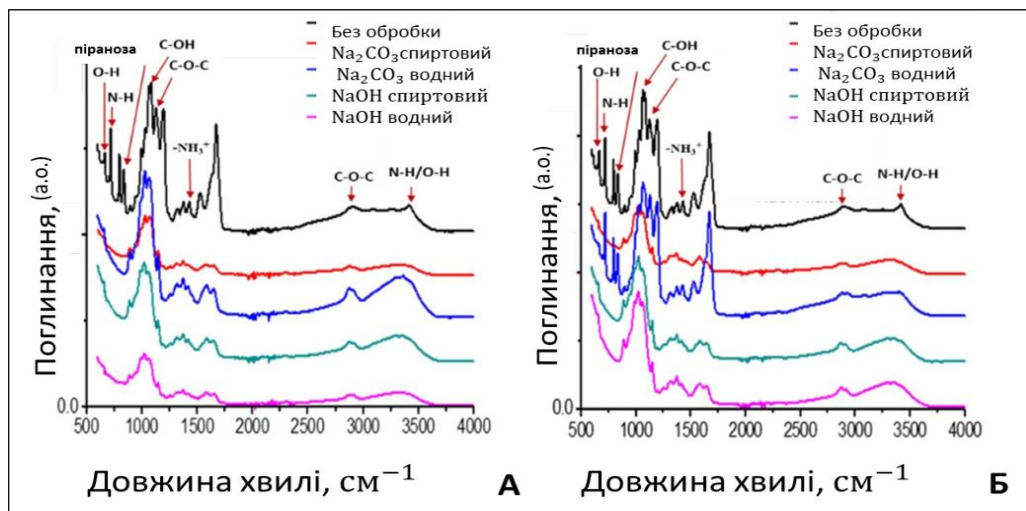


Рисунок 3.1 – Спектри ФТ-ІЧ-мембран хітозану, виготовлених за допомогою розчину 1 (А) та розчину 2 (Б)

Деякі механізми пояснюють структурні та хімічні особливості мембран Ch, виготовлених за допомогою різних розчинів. TFA може розчиняти полімер, утворюючи солі, що руйнують сильні взаємодії між молекулами хітозану. Утворення солі відбувається між TFA та аміногрупами по всій ланці хітозану після таких послідовних кроків: спочатку, протонування аміногруп ( $-NH_2$ ) по всій ланці хітозану; подальша іонна взаємодія між протонованими аміногрупами ( $-NH_3^+$ ) та утворення аніонів TFA.

Було встановлено, що розчинення відбувається завдяки утворенню амінових солей на аміногрупах C<sub>2</sub> (другий атом вуглецю на молекулі хітозану) з TFA, і відмічено, що в хітозану не відбувається трифлуороацетилювання в гідроксильних групах. TFA знижує температуру кипіння та поверхневий натяг, роблячи його відповідним розчинником для електропрядіння. Також було показано, що додавання невеликої кількості DMF полегшує електропрядіння хітозану, оскільки це в подальшому знижує температуру кипіння системи розчинника і також зменшує екстремальну щільність заряду, спричинену TFA. З цих причин у поточному дослідженні була обрана система розчинників TFA/DCM для виготовлення розчинів суміші хітозану та їх електропрядіння в нановолокнисті структури.

### 3.1.2 Сканувальна електронна мікроскопія (SEM)

Вибір розчинників є дуже важливим для електроспінінгу хітозану, щоб знизити поверхневий натяг розчину і створити стабільний струменевий потік під час процедури електроспінінгу [143]. Тонкі, циліндричні, безперервні та довільно орієнтовані нановолокна хітозану були успішно отримані завдяки високій леткості TFA та можливості блокування позитивних зарядів аміногруп на хітозані. Такі електропрядені нановолокнисті мембрани були багатошаровими, пористими, гнучкими та проникними для рідин із високою площею поверхні (рис. 3.2).

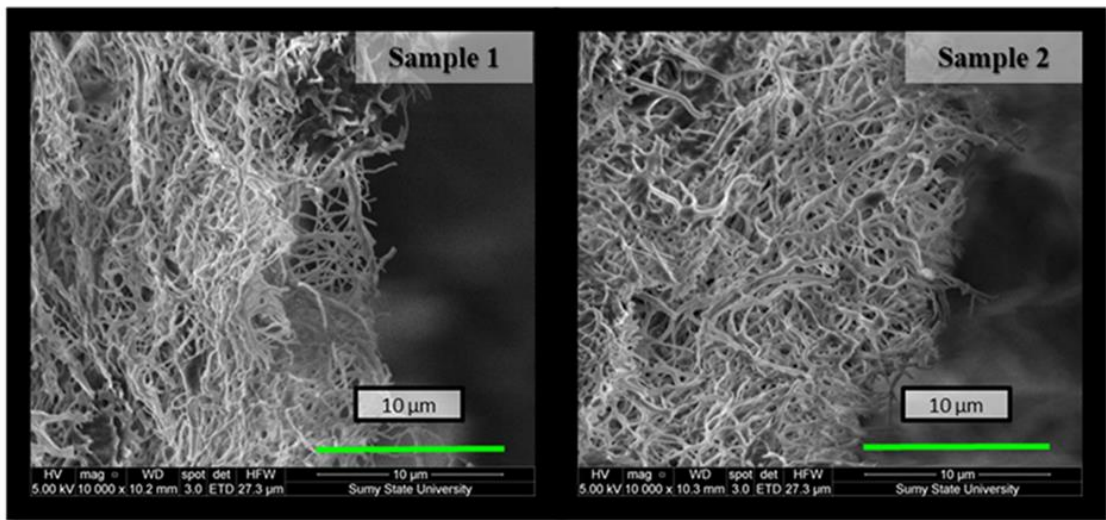


Рисунок 3.2 – Поперечний переріз SEM-зображення мембран Ch-TFA:DCM 7:3 (зразок 1) та Ch-TFA:DCM 9:1 (зразок 2)

SEM мікрографії електропрядених мембран, виготованих із розчину Ch із різними об'ємними співвідношеннями TFA/DCM (рис. 3.3 А). Усі зразки були вільні від потовщень, що свідчить про те, що випробувані умови електропрядіння Ch забезпечують достатнє переплетення ланцюгів для формування волокон. Утворення невеликих частинок на поверхні електропряденого волокна пов'язано з наявністю солей, що походять від розчинення Ch у TFA. Ці солі зазвичай спостерігаються для вищих концентрацій полімеру і вмісту TFA в розчині Ch-TFA/DCM. Поверхні мембран без нейтралізації відзначаються регулярністю та однорідністю, що виникає внаслідок процесу висихання. Середні діаметри волокон становили  $0,18 \pm 0,009$  мкм і  $0,2 \pm 0,01$  мкм для розчину 1 і розчину 2 відповідно. «Частка пористої області» мембрани, виготовленої з розчину 1 ( $38,94 \% \pm 5,6 \%$ ), була вищою, ніж для розчину 2 ( $5,4 \% \pm 1,9 \%$ ).

Середній діаметр волокон значно не зменшувався зі збільшенням умісту DCM. З іншого боку, спостерігався ширший розподіл величини волокон зі збільшенням умісту TFA в розчині. Мембрани, приготовані з розчину 1, демонстрували більш однорідний розподіл розмірів волокон (рис. 3.3 В).

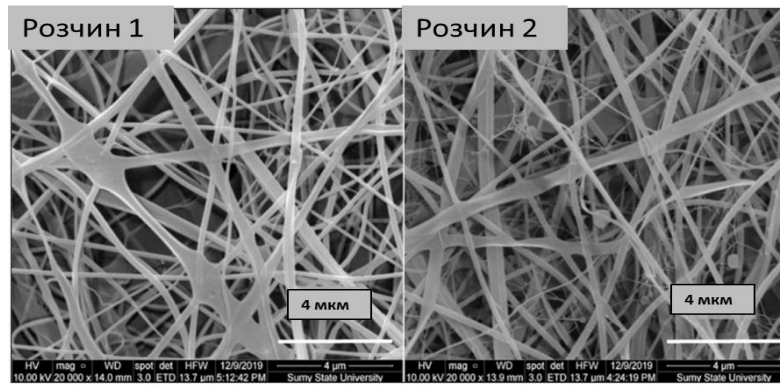


Рисунок 3.3 – Сканувальна електронна мікрофотографія електропрядених мембран із хітозану, виготовлених із розчину 1 (TFA/DCM = 7:3) (А) та розчину 2 (TFA/DCM = 9:1) (Б)

Розподіл розмірів волокон у зразках після лужного оброблення узагальнено (рис. 3.4). Нановолокнисті мембрани, які були нейтралізовані у водних розчинах  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  або спиртових розчинах  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , не зберігали нановолокнистої структури, а виявляли плівкову структуру. Отже, було неможливо характеризувати розмір волокон для будь-яких мембран після оброблення  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

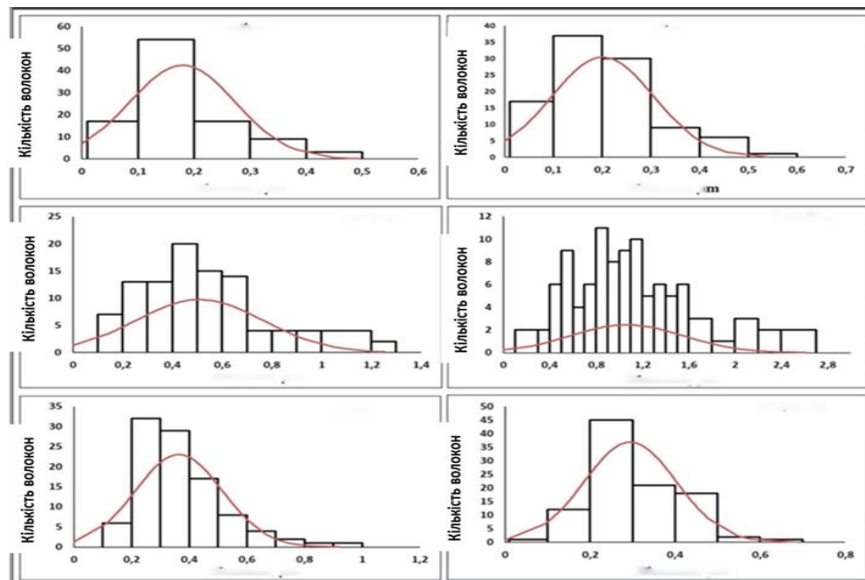


Рисунок 3.4 – Діаграми розподілу діаметрів волокон мембран хітозану, виготовлених за допомогою розчину 1 та розчину 2 після нейтралізації у водних та спиртових (70 % етанол / 30 % вода) розчинах 1 М NaOH та 1 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

Традиційна нейтралізація у водному NaOH зберігала лише часткову нановолокнисту структуру (рис. 3.5). Діаметр волокон мембран розчину 1 і розчину 2 збільшився до  $0,52 \pm 0,025$  мкм і  $1,07 \pm 0,048$  мкм відповідно через частковий набряк протонowanego Ch за першого контакту з водним розчином. Навпаки, SEM підтвердило стабільність нановолокнистої структури після оброблення спиртовим розчином NaOH (70 % етанол / 30 % вода). Діаметр волокон збільшився до  $0,37 \pm 0,015$  мкм і  $0,3 \pm 0,01$  мкм для мембран розчину 1 і розчину 2 відповідно. Попереднє дослідження також показало, що нейтралізація мембран Ch збільшувала набрякання нановолокон без зміни їх морфології.

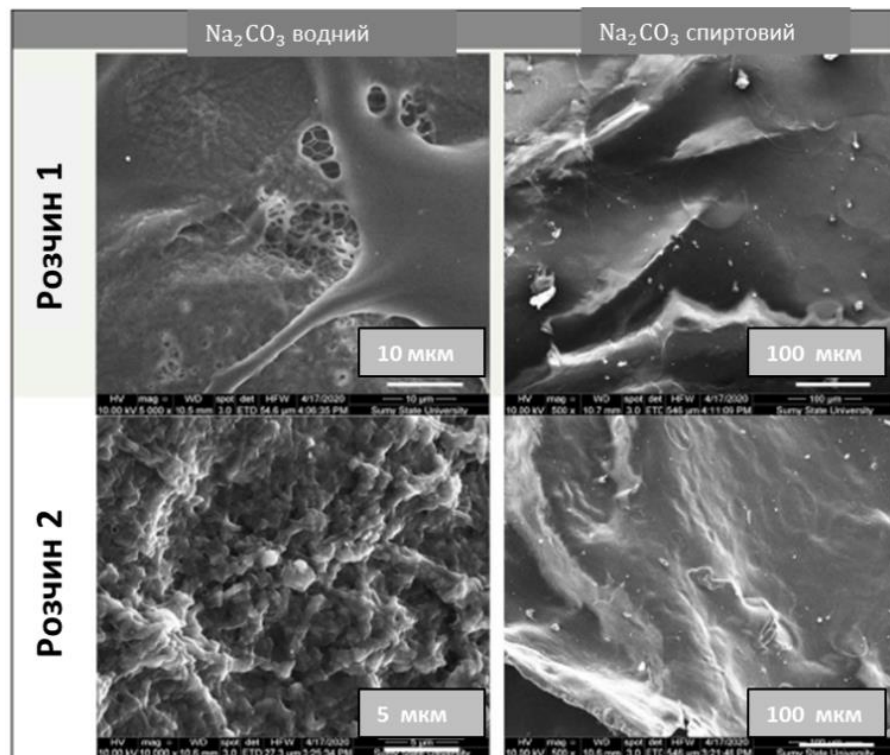


Рисунок 3.5 – Сканувальні електронні мікрофотографії мембран хітозану, виготовлених за допомогою розчину 1 та розчину 2 після нейтралізації у водних та спиртових розчинах 1 М NaOH та 1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>



SEM-зображення також показали, що в обох варіантах мембран спостерігаються гладкі волокна з діаметром у нанодіапазоні [144]. Однак морфологія нановолокнистої мембрани залежала від концентрації TFA/DCM у розчині. Хоча і зразок 1, і зразок 2 були виготовлені за однакових умов електроспінінгу, їх діаметр волокон становив  $0,18 \pm 0,009$  і  $0,2 \pm 0,010$  мкм відповідно, й, отже, орієнтація волокон істотно впливала на пористість мембрани – «частку пористої площі» (рис. 3.6) [145].

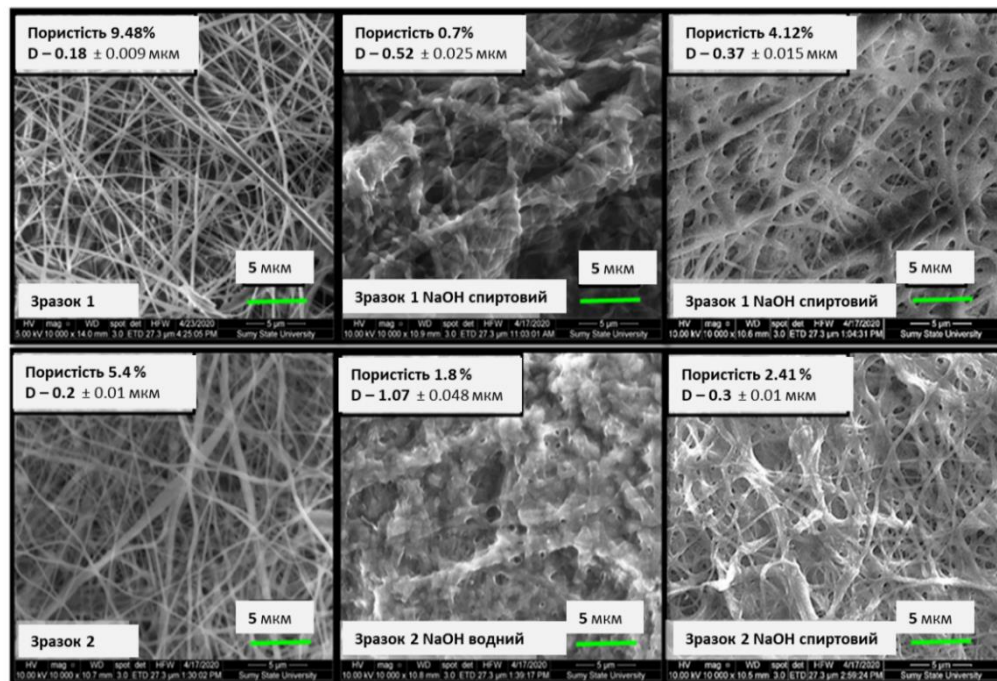


Рисунок 3.6 – Сканувальні електронні мікрографії з «часткою пористої області» зразка 1 (хітозан-ТФА/DCM 7:3) та зразка 2 (хітозан-ТФА/DCM 9:1) електропрядених мембран після оброблення водним розчином NaOH та спиртовим розчином NaOH

Наведені результати SEM для нановолокон після електропрядіння та після оброблення різними лужними розчинами (рис. 3.6). Зразки обох розчинів показали впорядковані, випадково орієнтовані, циліндричні нановолокна. Після лужного оброблення діаметри нановолокон, які обробляли 1 М водним розчином NaOH, трохи збільшилися. Середній діаметр немодифікованого зразка 2 був вимірний як  $0,2 \pm 0,010$  мкм, збільшившись до  $1,07 \pm 0,048$  мкм у випадку зразків, які обробляли 1 М водним розчином NaOH, та лише до  $0,3 \pm 0,01$  мкм з

1 М NaOH 70 % спиртовим. Наш попередній дослід також підтвердив, що нейтралізація мембран хітозану водним розчином NaOH збільшує розмір нановолокон унаслідок набряку, не змінюючи волокнистої морфології. Спиртовий розчин NaOH дає більш м'яке оброблення й краще зберігає високопористу структуру порівняно з водним розчином.

### 3.1.3 Дослідження показників деградації

Під час занурення в PBS здатність до набряку оброблених лужним розчином мембран хітозану, приготовлених у системі 9:1 TFA/DCM, була в 2 та 1,5 раза вищою, ніж у нановолокон, створених у системі 7:3 TFA/DCM після 20 та 60 хв підмочування в PBS відповідно (рис. 3.7 А). Втрата маси була значно вищою для мембран, виготовлених розчином 2, ніж для розчину 1 ( $p < 0,05$ ) у першій і третій дні експерименту. Однак втрата маси мембран, виготовлених із розчину 1, була значно вищою після 1 тижня та 1 місяця занурення в PBS (рис. 3.7 Б). Деградація полімерів хітозану відбувається шляхом гідролізу та окиснення. Деградація за гідролітичним механізмом передбачає реакцію слабких зв'язків у полімері з водою. Швидкість деградації залежить від доступу води до матриці полімеру, а не від внутрішньої швидкості розщеплення естерів. У цьому дослідженні після нейтралізації в NaOH-етанолі нановолокна електропряденої мембрани хітозану зберегли свою структуру навіть після продовженого занурення в PBS (рН 7,4) протягом 1 місяця. Тривале занурення в PBS вплинуло на загальну нановолокнисту структуру та спричинило розпад мембран (рис. 3.7 В, рис. 3.7 Г). Після 1 місяця спостерігалися руйнування пор, утворення великих отворів, злипання волокон та поява мікротріщин. Електропрядені мембрани хітозану, оброблені  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , проявляли різні характеристики деградації залежно від співвідношення розчинників. Нановолокнисті мембрани, виготовлені з розчину 9:1 TFA/DCM, виявили збільшення здатності до набряку та втрати маси. Ці відмінності можуть пояснюватися видаленням TFA та відповідно зменшенням маси при нейтралізації та зануренні в PBS у межах початкових часових точок експерименту.

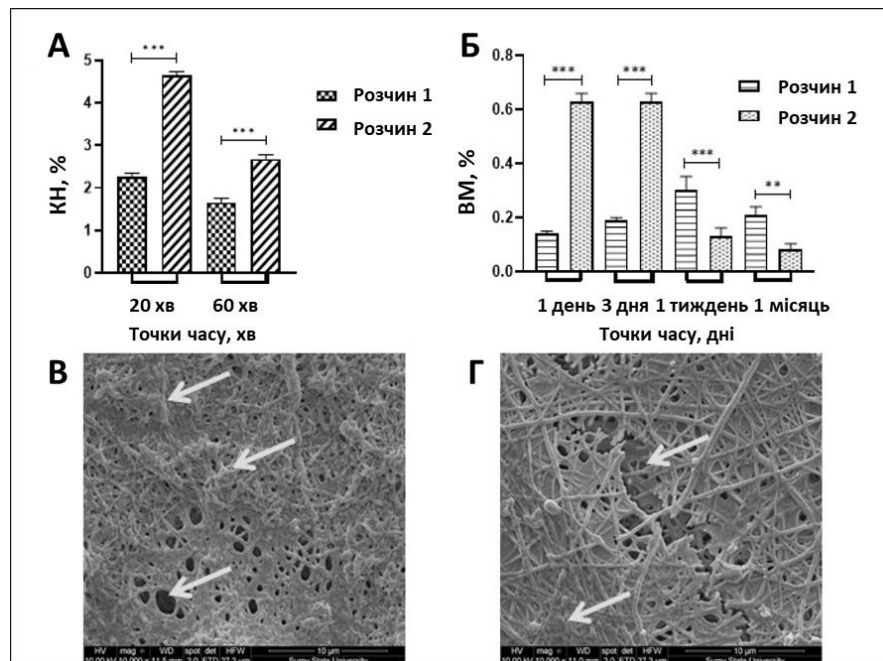


Рисунок 3.7 – Кінетика деградації (здатність до набряку (А) та втрата маси (Б)) після нейтралізації електропрядених нановолокнистих мембран хітозану з різними співвідношеннями TFA / DCM та сканувальні електронні мікрофотографії мембран хітозану у фосфатно-буферному розчині (В та Г). Стрілки показують дефекти матеріалу. Статистична значущість свідчить про відмінності між різними групами: \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$

### 3.1.4 Оцінювання біосумісності та цитотоксичності мембран

Важливо відзначити, що всі мембрани зберегли свою структуру протягом 6 днів інкубації, за винятком зразка, обробленого 1 М розчином  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Клітини залишалися життєздатними протягом періоду спостереження. Показник метаболічної активності клітин незначно відрізнявся між групами і становив приблизно 50 % редукції резазурину. Мембрани, виготовлені з розчину 1, проявили відповідну проліферацію клітин на 3-й та 6-й дні без значної відмінності між методами нейтралізації (рис. 3.8 А). Проліферація клітин у мембранах, виготовлених із розчину 2, сильно залежала від методу нейтралізації (рис. 3.8 Б). На 3-й та 6-й дні мембрани, оброблені спиртовими розчинниками, демонстрували значно нижчу швидкість редукції резазурину порівняно з мембранами, обробленими або водним розчином  $\text{NaOH}$ , або  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .



Сканувальні електронні мікрофотографії хітозанових мембран на 6-й день демонструють рівномірний розподіл клітин по поверхні зразків. Клітини U2OS мають витягнуту форму з короткими й довгими відростками, що контактують із нановолокнами (рис. 3.8 В). З динамікою експеримента (рис. 3.8 Г), клітини глибоко інтегруються з нановолокнами, покриваючи стінки волокон, що свідчить про міграцію клітин у пори мембрани.

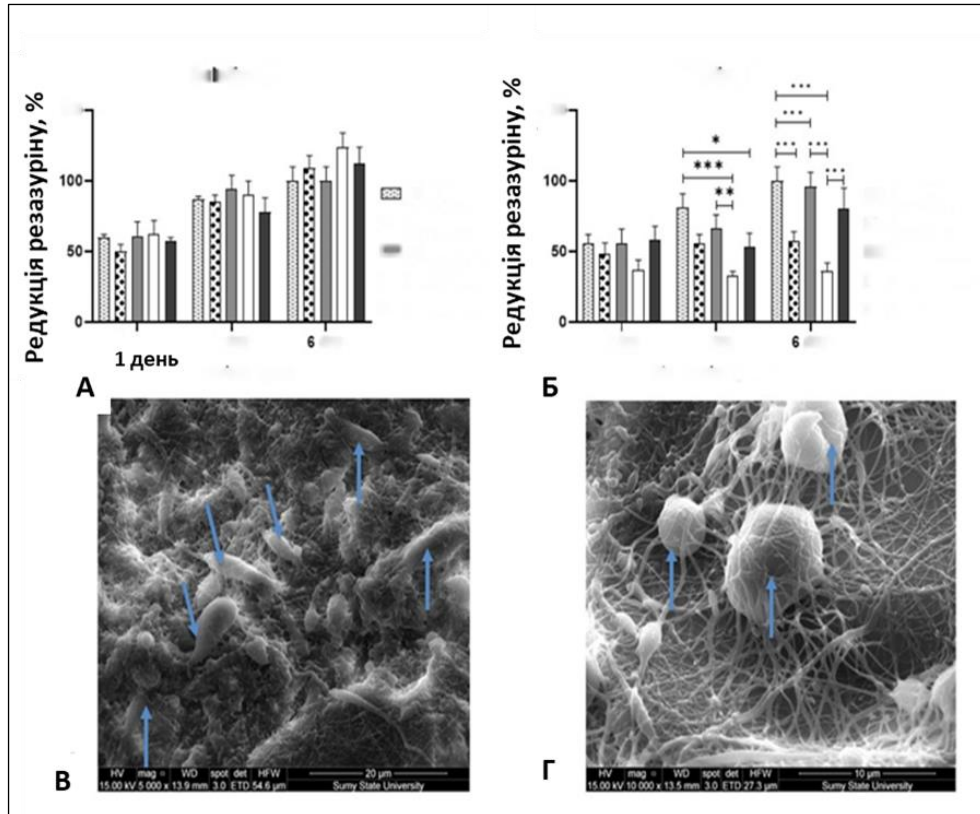


Рисунок 3.8 – Аналіз редукції резазурину з клітинами U2OS, що адгезувалися та проліферували на мембранах із хітозану, виготовлених із розчину 1 (А) та з розчину 2 (Б). Панелі В та Г демонструють розподіл клітин U2OS по мембрані хітозану через 6 днів після посіву клітин. Сині стрілки показують клітини.

Статистична значущість свідчить про відмінності між різними групами:

$$**p \leq 0,01, ***p \leq 0,001$$

### 3.1.5 Оцінювання антибактеріальної активності *in vitro*

#### 3.1.5.1 Тест на антибактеріальні властивості в динамічному контакті з бактеріальною культурою

Антибактеріальну активність мембран хітозану досліджували впродовж 8 годин. Дослідження показують, що як зразки Ch-TFA/DCM 7:3 (зразок 1), так і зразки Ch-TFA/DCM 9:1 (зразок 2) були ефективнішими в знищенні *E. coli*, ніж *S. aureus* після 2-годинного інкубаційного періоду, тоді як через 4 години *S. aureus* був більш чутливим (рис. 3.9 А). Крім того, порівняно з мембранами Ch-TFA/DCM 7:3 зразки Ch-TFA/DCM 9:1 були ефективнішими в знищенні *E. coli* протягом 6 годин ( $p < 0,001$ ). Однак після 8 годин обидва зразки не проявляли антибактеріальної активності ні проти *S. aureus*, ні проти *E. coli* (рис. 3.9 Б).

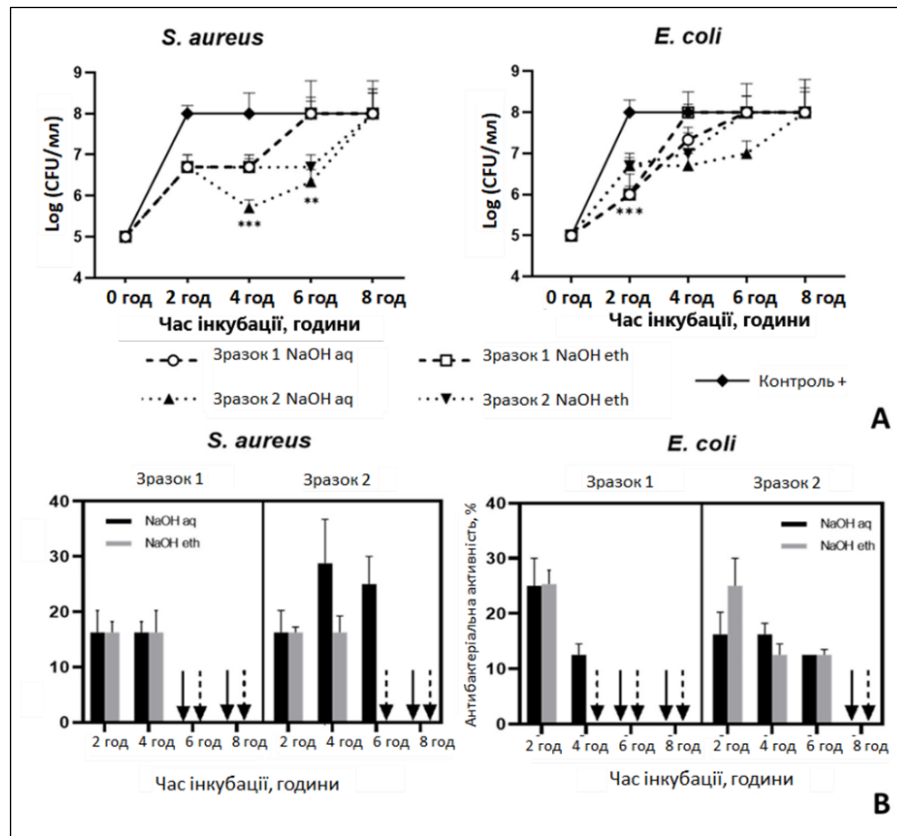


Рисунок 3.9 – Антибактеріальна ефективність мембран, виготовлених із розчинів хітозану TFA:DCM у співвідношенні 7:3 та TFA:DCM у співвідношенні 9:1, проти *S. aureus* та *E. coli*; (А) кількість бактерій, КУО/мл; (Б) R – рівень бактеріальної редукції. Статистична значущість свідчить про відмінності між різними групами: \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$

### 3.1.5.2 Антиадгезивні властивості в тесті на відновлення резазурину

Метаболічна активність біофільних клітин була оцінена за допомогою резазурину для визначення концентрації живих бактеріальних клітин у зразках (рис. 3.10). Для встановлення зв'язку між концентрацією бактерій у зразку та інтенсивністю поглинання резорурфіну була побудована діаграма редукції резазурину для обох видів бактерій.

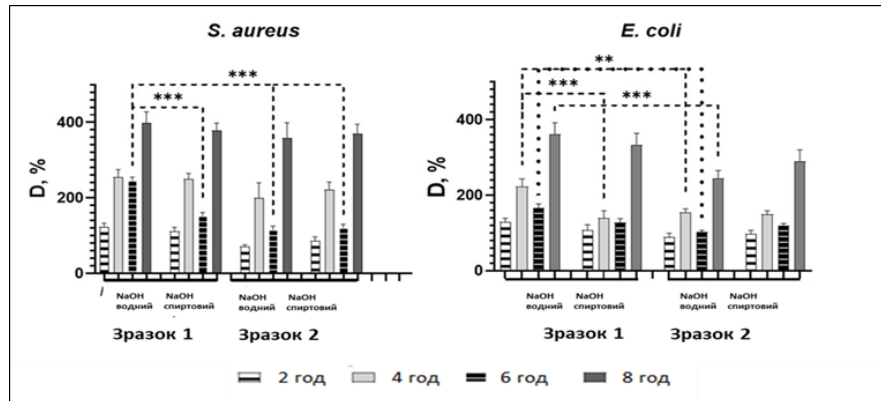


Рисунок 3.10 – Здатність мембран хітозану зменшувати утворення біоплівки на основі аналізу редукції резазурину. Статистична значущість свідчить про відмінності між різними групами: \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$

Обидва мікроорганізми продемонстрували подібну тенденцію щодо виживання після інкубації зі зразками. Однак виявлено вище значення чутливості для *E. coli* на всіх часових проміжках спільного культивування. Всі зразки показали найвищий бактеріостатичний ефект через 6 годин. Для обох досліджуваних бактерій значення R, %, продовжувало зростати до кінця інкубації (8 годин) незалежно від співвідношення розчинників й типу оброблення. Ми виявили, що ерадикація біофільму відрізнялася залежно від системи розчинів, використаних для приготування розчину хітозану. Дослідження показали більш ефективне зменшення бактеріальної біоплівки для Ch-TFA/DCM 9:1 (зразок 2). Загалом не було виявлено значних відмінностей у запобіганні утворенню біоплівки між двома мікрорганізмами незалежно від оброблення. В іншому випадку *S. aureus* був менш чутливим до зразка 1 (Ch-TFA/DCM 7:3), обробленого в розчині NaOH, порівняно з усіма іншими

дослідними зразками ( $p < 0,001$ ), тоді як *E. coli* показала цю тенденцію лише порівняно з аналогічно обробленим зразком Ch-TFA/DCM 7:3 ( $p < 0,01$ ), але також на 6-й годині ( $p < 0,01$ ).

### 3.1.5.3 Вивчення морфології бактеріальної біоплівки за допомогою SEM

Результати показали бактеріостатичну активність мембран Ch щодо *E. coli* та *S. aureus*. Життєздатність бактеріальних клітин була найнижчою для обох тестованих організмів для мембран Ch-TFA/DCM 9:1 (зразок 2). Спостереження за допомогою сканувального електронного мікроскопа (SEM) показало велику кількість *S. aureus*, що прикріпилися до поверхні мембран Ch, утворюючи типову структуру біоплівки (рис. 3.11).

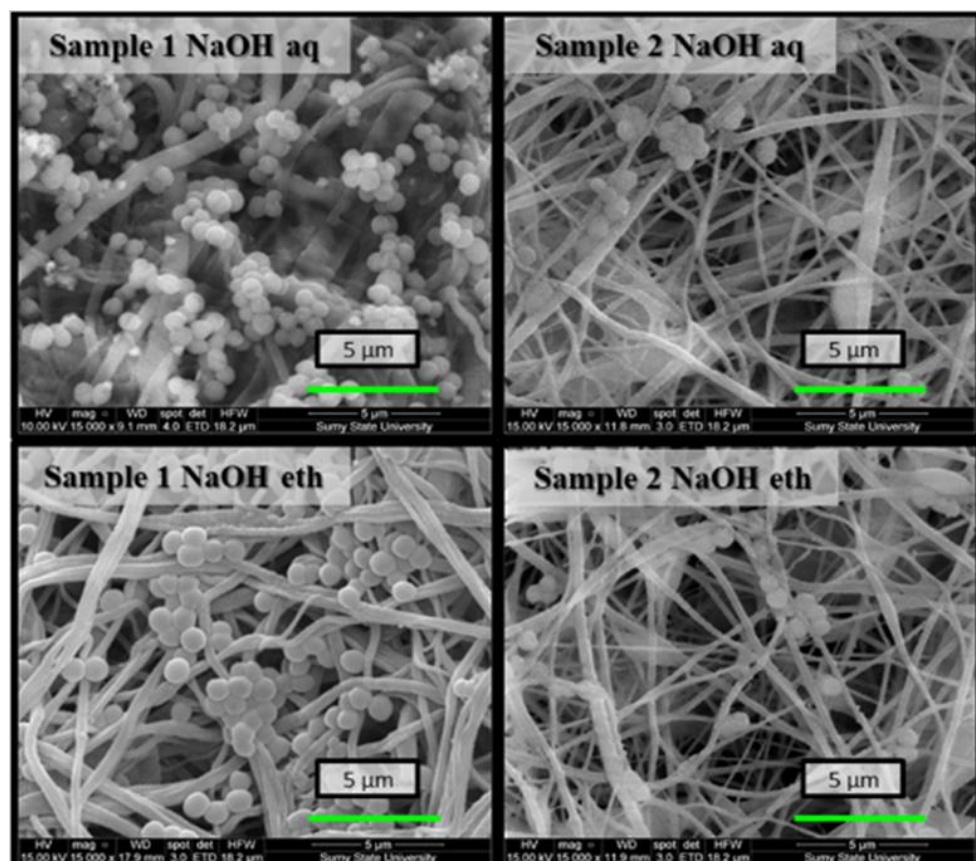


Рисунок 3.11 – SEM-зображення бактеріальних біоплівок на поверхнях нановолокнистих мембран після 8-годинного культивування в бактеріальній суспензії *S. aureus*

В клітинах обох мікроорганізмів виявили порушення мембран або аномалію форми та розміру клітин. Структура клітин *S. aureus* була зруйнована, що свідчить про антибактеріальну ефективність нановолоконної мембрани. Також спостерігали зміну цілісності клітинної мембрани *E. coli* (прорив мембрани, що призвело до витоку цитоплазматичних компонентів). Унаслідок цього бактеріальні клітини стали прозорими та порожніми (рис. 3.12).

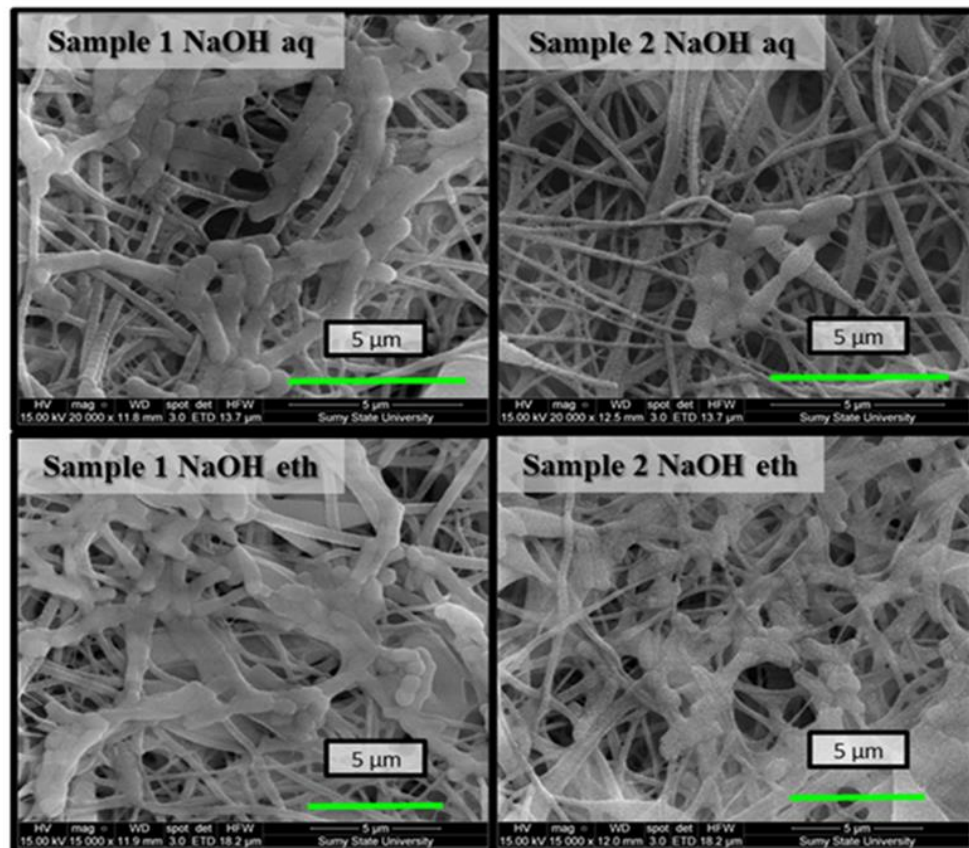


Рисунок 3.12 – SEM-зображення бактеріальних біоплівки на поверхнях нановолокнистих мембран після 8-годинного культивування в бактеріальній суспензії *E. coli*

Всі протестовані мембрани здатні стримувати проникнення бактерій у живильне середовище (рис. 3.13). Це явище можна пояснити хелатуючою дією хітозану, що впливає на ріст та гомеостаз бактерій [146]. Отже, нановолокнисті мембрани, виготовлені з обох розчинів, можуть обмежувати ріст як грампозитивних, так і грамнегативних мікроорганізмів без залежності від типу



оброблення. Проте *E. coli* виявила більшу чутливість до зразків. Крім того, мембрани, виготовлені з розчину 1, ефективніше стримували ріст бактерій, ніж зразки, виготовлені з розчину 2.

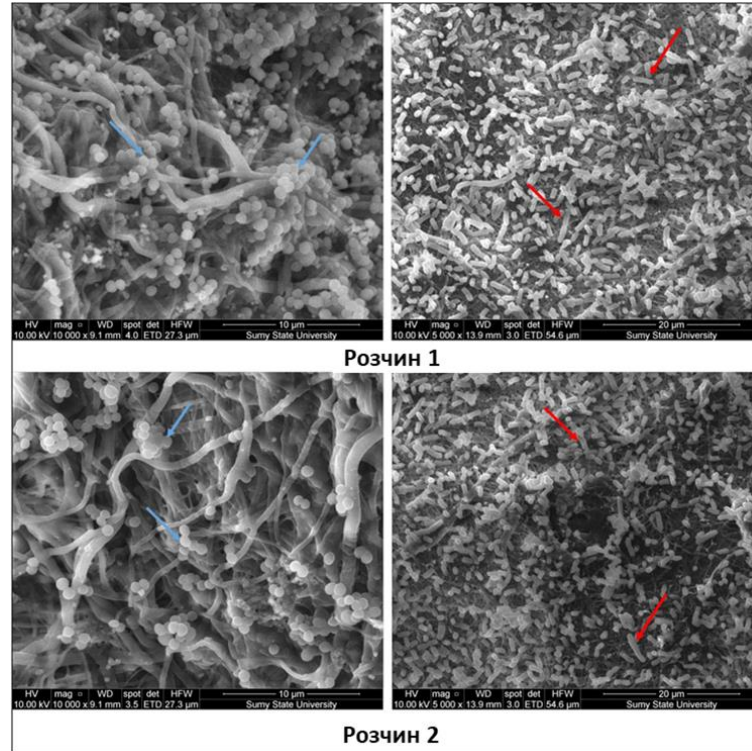


Рисунок 3.13 – Сканувальні електронні мікрофотографії росту *S. aureus* (сині стрілки) та *E. coli* (червоні стрілки) на нановолокнистих мембранах хітозану, оброблених водним  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  після 8 годин спільного культивування

SEM демонструвала, що мікроорганізми ростуть на поверхні мембрани і не проникають усередину пор. Групи  $\text{NH}_3^+$  хітозану можуть зв'язуватися з від'ємно зарядженими грамнегативними бактеріями та стримувати їх розмноження. Крім того, хітозан може формувати полімерну оболонку грампозитивних мікроорганізмів, яка запобігає обміну клітинами та поглинає поживні речовини. Крім того, ліпотьохоева кислота клітинної стінки грампозитивних бактерій може зв'язувати бактеріальну мембрану з ланцюгом хітозану, що стримує проліферацію бактерій [147].

Електропрядені мембрани з хітозану демонструють високий потенціал для використання в біомедичних застосуваннях завдяки своїм відомим фізико-

хімічним властивостям. Однією з ключових переваг таких мембран є їх висока пористість, що забезпечує значну площу поверхні для адгезії клітин та проникнення рідин. Це робить їх особливо корисними для застосувань, де необхідна взаємодія з біологічними середовищами, таких як регенерація тканин та загоєння ран.

Гідрофільність мембран із хітозану сприяє поліпшенню біосумісності, оскільки гідрофільні поверхні краще взаємодіють із водними розчинами та біологічними рідинами, що є важливим для підтримки життєздатності клітин на поверхні мембрани. Це також сприяє рівномірному розподілу клітин по поверхні мембрани та їх глибокому інтегруванню з нановолокнами, що важливо для створення ефективних тканинних інженерних конструкцій.

Біосумісність мембран із хітозану підтверджується низькою цитотоксичністю, яка була продемонстрована в дослідженнях із застосуванням клітинних культур. Мембрани зберігають свою структуру протягом тривалих періодів інкубації, забезпечуючи підтримку клітинного росту та проліферації. Це робить їх перспективними для використання в медичних імплантатах та інших біомедичних виробках, де необхідна тривала стабільність і сумісність із біологічними тканинами.

Антибактеріальна активність мембран хітозану є ще однією важливою властивістю, яка робить їх привабливими для медичних застосувань. Мембрани ефективно стримують ріст як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій, що знижує ризик інфекцій під час використання цих матеріалів у клінічних умовах. Це відкриває можливості для їх використання як антибактеріальних покриттів.

Вибір відповідних розчинників для електроспінінгу та оптимізація умов оброблення є критичними факторами, що впливають на якість отриманих нановолокон. Правильний підбір розчинників дозволяє створити стабільні електропрядені мембрани з покращеними механічними властивостями, такими як міцність та гнучкість. Це також забезпечує можливість контролювати пористість і діаметр волокон, що важливо для різних біомедичних застосувань.

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на вивчення

довготривалих ефектів застосування таких мембран у різних біологічних системах. Це включає вивчення їх деградації в організмі, впливу на різні типи клітин і тканин, а також розроблення нових методів їх модифікації для покращання біосумісності та функціональних характеристик. Наприклад, введення додаткових біоактивних компонентів, таких як наночастинки металів, може посилити їх антимікробні властивості.

Отже, електропрядені мембрани з хітозану мають значний потенціал для розвитку інноваційних біомедичних технологій і можуть стати важливим інструментом у створенні нових матеріалів для медицини.

### 3.2 Результати дослідження мембран із хітозану та полімолочної кислоти методом електропрядіння

#### 3.2.1 Сканувальна електронна мікроскопія (SEM)

Нановолокна, які були досліджені, мали більш рівномірний розподіл діаметрів та «частки пористої області» в Ch/PLA-мембрані для всіх зразків (рис. 3.14).

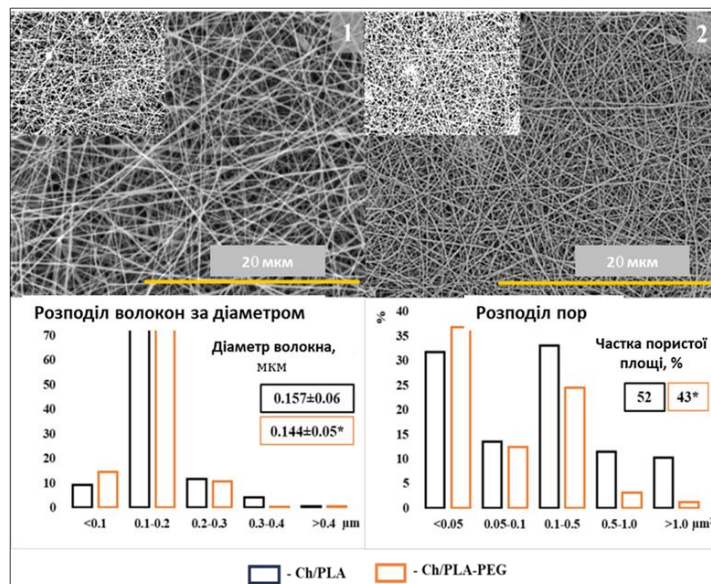


Рисунок 3.14 – SEM-зображення: електропрядені мембрани (1 – Ch/PLA та 2 – Ch/PLA-PEG), частота «розподілу волокон за діаметром» та значення «частки пористої області» електропрядених мембран. Збільшення основних зображень – x5.0K (масштаб 20 мкм)



Покращена волокнуотворювальна здатність розчинів із додаванням PLA сприяла утворенню волокон із пористою структурою без потовщень. Отримані мембрани (1 – Ch/PLA та 2 – Ch/PLA-PEG) продемонстрували багатошарову структуру з хаотично розміщених нановолокон (рис. 3.15).

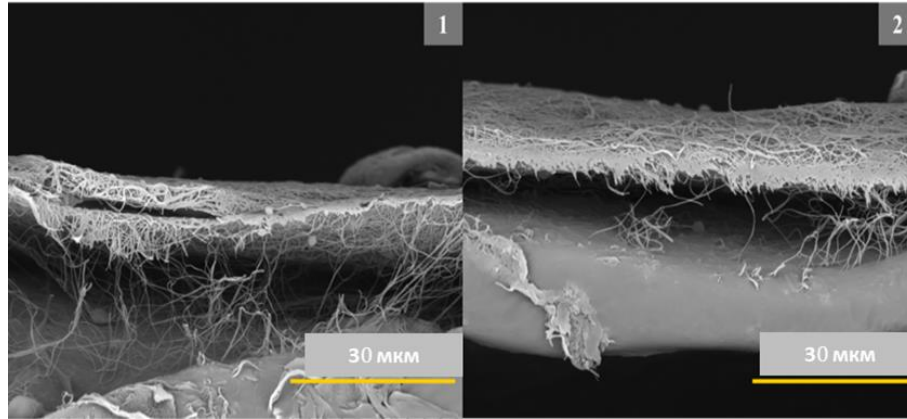


Рисунок 3.15 – SEM-зображення: поперечний переріз мембран (1 – Ch/PLA та 2 – Ch/PLA-PEG)

Залежно від розміру волокон їх кількість варіювала. Зразки з меншими розмірами волокон містили меншу кількість волокон. Додавання PEG призвело до формування тонших волокон із демонстрацією більшої кількості волокон у нанометровому діапазоні, особливо з діаметром, меншим за 100 нм. До того ж додавання PEG до зразка призвело до збільшення кількості пор розмірами до 50 нм<sup>2</sup>.

Одержані результати довели, що зменшення середнього діаметра волокон було результатом додавання PEG. Додавання PEG до електропряденої мембрани привело до зменшення площі пор. Це свідчить про те, що наявність PEG покращує процес електропрядіння розчину. Електропровідність розчину значно підвищилася, що привело до збільшення кількості волокон із діаметром у нанометровому діапазоні. Таким чином, за однакових умов напруги і відстані розчин із більшою електропровідністю демонструє більше подовження струменя вздовж своєї осі, результатом цього є утворення волокон меншого діаметра. Отже, ці вдосконалення процесу електропрядіння покращують якість нановолокон.

### 3.2.2 Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є

На рисунку 3.16 продемонстровані результати ІЧ-Фур'є-аналізу. Типові для хітозану смуги продемонстровані на всіх спектрах (1–6).

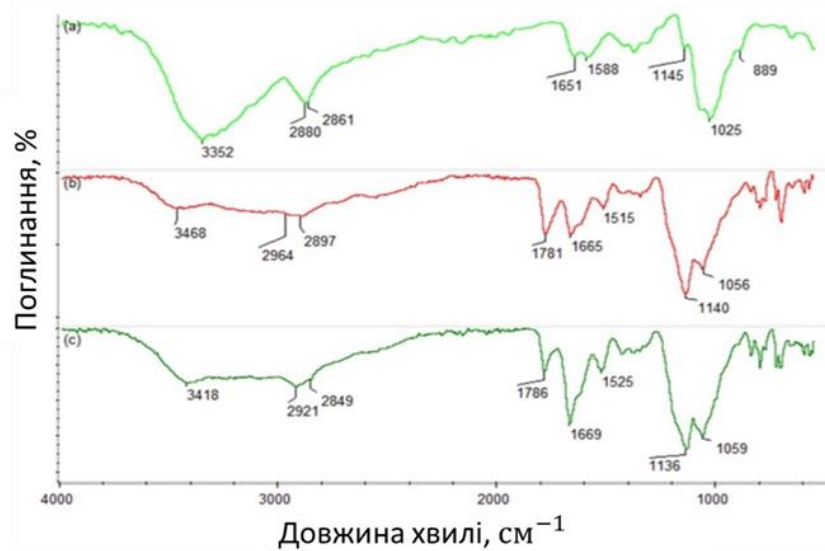


Рисунок 3.16 – ІЧ-Фур'є-аналіз (1 – необроблені Ch/PLA, 2 – необроблені Ch/PLA-PEG, 3–4 – оброблені Ch/PLA, 5–6 – оброблені Ch/PLA-PEG)

Спектр електропряденої мембрани з композиту Ch/PLA (зразок 1; 1), демонструє смугу від гідроксильних груп хітозану та PEG при  $3380\text{ cm}^{-1}$ . Дві смуги характерні для аліфатичних фрагментів, притаманних усім трьом полімерам ( $-\text{CH}_3$  і  $-\text{CH}_2-$ ), наявні при  $2882\text{ cm}^{-1}$  і  $2866\text{ cm}^{-1}$  відповідно. Наявна також смуга низької інтенсивності при  $1655\text{ cm}^{-1}$ , що відповідає N-ацетилглюкозаміну. До того ж смуги, характерні для вільних аміногруп, наявні в області  $1600\text{ cm}^{-1}$  і  $1147\text{ cm}^{-1}$ . Водночас смуги, які можна віднести до глікозидних зв'язків та глюкопіранозних кілець, наявні при  $1099\text{ cm}^{-1}$  та  $842\text{ cm}^{-1}$ . Щодо смуг, що відповідають ефірним зв'язкам, через низький вміст PLA в мембрані вони не простежуються. Мембрану з Ch/PEO та PLA/PEO демонструє спектр 2. Смуга від OH-груп наявна при  $3371\text{ cm}^{-1}$ , а смуги, характерні для аліфатів, – при  $2949\text{ cm}^{-1}$  і  $2882\text{ cm}^{-1}$ . Разом із глікозидними зв'язками між хітозановими кільцями та кільцями глюкопіранози ( $1061\text{ cm}^{-1}$  і  $842\text{ cm}^{-1}$ ,

відповідно) наявні смуги амідних зв'язків при  $1650\text{ см}^{-1}$ , а також смуги  $\text{NH}_2$  ( $1597\text{ см}^{-1}$ ;  $1147\text{ см}^{-1}$ ). Мембрани, що були оброблені водним розчином  $\text{NaOH}$ , представлені спектрами 3 та 4. В обох випадках помітно, що інтенсивність смуг аліфатичних груп (мембрани 1 і 2:  $2949\text{ см}^{-1}$ ,  $2879\text{ см}^{-1}$ ) зменшилася порівняно зі смугами гідроксильних / карбоксильних груп ( $3319\text{ см}^{-1}$ ;  $3358\text{ см}^{-1}$ ), що свідчить про деградацію зв'язків між полімерними мірами без видимих змін у структурі хітозану. У спектрах зразків 5 і 6, оброблених етанольним розчином гідроксиду натрію, так само, як і в зразках 3 та 4, наявне збільшення інтенсивності смуг  $-\text{COOH}$  і  $-\text{OH}$  без зменшення інтенсивності глікозидних зв'язків і глюкопіранозних кілець. Це свідчить про те, що постоброблення основними розчинами призводить до незначних змін у хімічному складі зразка.

### 3.2.3 Дослідження показників деградації

Молекулярний ланцюг PEG руйнується швидше, ніж ланцюг PLA під час контакту полімеру з водою. Отже, полімер, що містить PEG, деградує швидше [148]. Втрата маси електропрядених мембран під час експерименту з деградації не збільшилася з додаванням PEG до розчину. Трохи нижчу швидкість деградації (протягом 1-го тижня випробувань) показують гібридні волокнисті матеріали, виготовлені із системи співрозчинників Ch/PLA-PEG (рис. 3.17). Втім, виходячи зі статистичного аналізу, профіль деградації волокон без PEG і з PEG кардинально не відрізняється. Результат, що був отриманий, став наслідком вторинних взаємодій між PLA і Ch під час розчинення полімерів, що можуть піддаватися гідролізу. Такі вторинні взаємодії спричиняють утворення більш коротких ланцюгів у кислому середовищі [149].

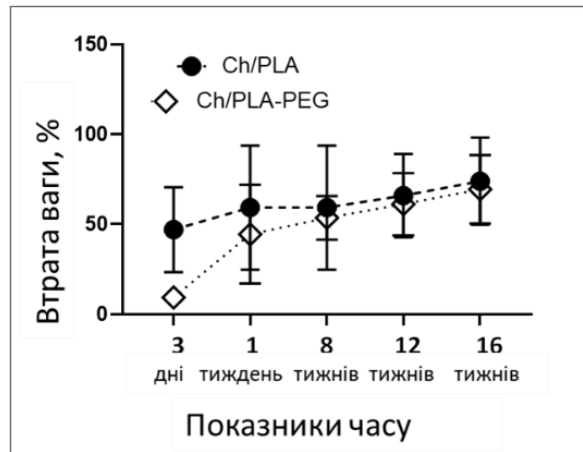


Рисунок 3.17 – Показники деградації зразків Ch-PLA та Ch/PLA-PEG в фосфатно-буферному сольовому розчині

### 3.2.4 Характеристика змочуваності поверхні

Волокна з розчину Ch/PLA продемонстрували рівні змочуваності  $54,77 \pm 10,38^\circ$ , у той час як із розчину Ch/PLA-PEG –  $51,97 \pm 12,11^\circ$  (рис. 3.18). Проте збільшення поверхневої гідрофільності може значно покращити біосумісність та функціональність матеріалів [150]. Беручи до уваги збільшену площу поверхні нановолокон, виняткового значення набуває максимізація їх поверхневої гідрофільності. Ось чому регуляція складу та співвідношення компонентів суміші має велике значення для покращання змочуваності мембрани Ch/PLA. Згідно з результатами наших випробувань наявність PEG покращує гідрофільність мембрани шляхом зменшення контактного кута до  $20,28 \pm 3,06^\circ$  та  $22,65 \pm 7,40^\circ$  відповідно до необроблених та оброблених зразків. Такі зміни можна пояснити вищою гідрофільністю PEG-блоку порівняно з PLA, що призводить до підвищення загальної змочуваності.

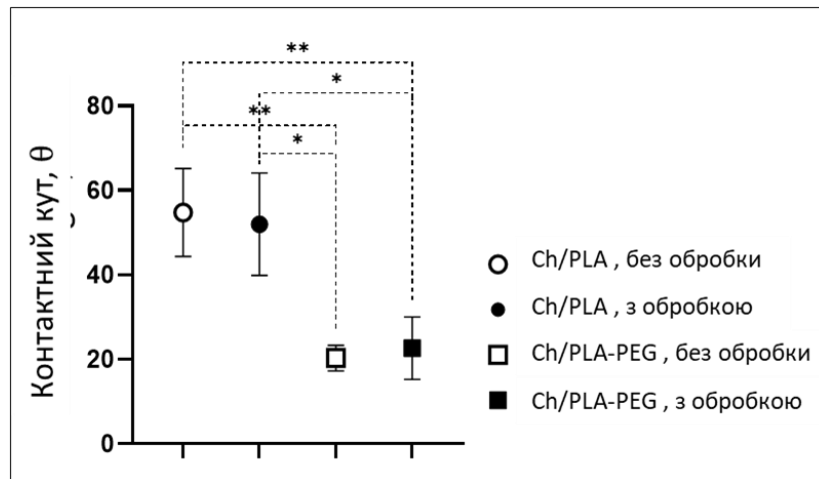


Рисунок 3.18 – Контактний кут зразків Ch-PLA та Ch/PLA-PEG – без нейтралізації та з нейтралізацією розчином NaOH; \* – позначають достовірні відмінності між групами за  $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$ ;  $***p \leq 0,001$

### 3.2.5 Оцінювання біосумісності та цитотоксичності мембран

Згідно з результатом аналізу загальної метаболічної активності всі зразки мають рівні відновлення резазурину близькі до значень позитивного контролю. Це свідчить про нетоксичність мембран для клітин (рис. 3.19). Мембрани, що містять PEG і не містять PEG, істотно не відрізняються одна від одної. Варто констатувати, що рівень відновлення резазурину в обох групах з обробленими зразками більший, ніж з необробленими.

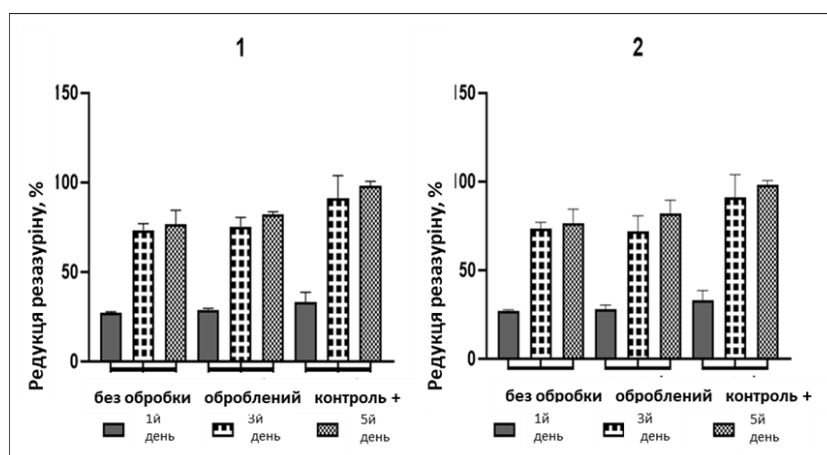


Рисунок 3.19 – Редукція резазурину під час проліферації мишачих меланомних клітин B16F10 на електропрядених мембранах (1 – Ch/PLA та 2 – Ch/PLA-PEG)

### 3.2.6 Оцінювання антибактеріальної активності *in vitro*

#### 3.2.6.1 Швидкість бактеріальної редукції в динамічному контакті з бактеріальною культурою

Бактеріологічні дослідження зразків Ch/PLA-PEG свідчать про підвищену антибактеріальну активність проти обох видів бактерій через 4 години та 6 годин інкубації (рис. 3.20).

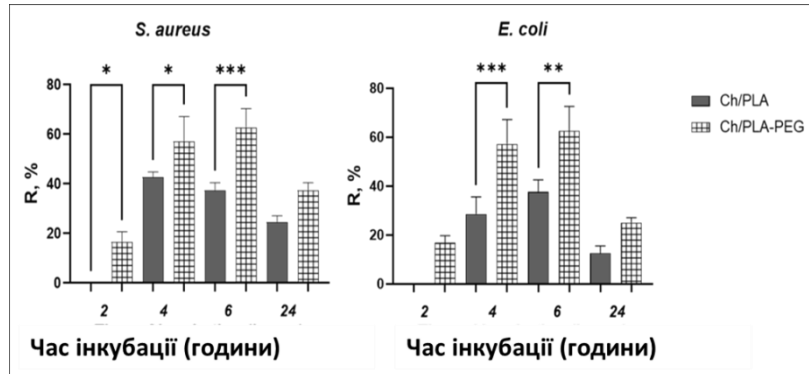


Рисунок 3.20 – Антибактеріальна ефективність мембран Ch/PLA та Ch/PLA-PEG (R – рівні бактеріальної редукції, %); \* – позначають достовірні відмінності між групами за  $*p \leq 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$

Має сенс зауважити, що у зазначені часові точки *E. coli* більш чутлива до антибактеріального ефекту мембран Ch/PLA-PEG. Зразки, що містять PEG, показують більш ефективне пригнічення росту бактерій через дві години спільного культивування з *S. aureus* ( $p < 0,05$ ), якщо порівнювати зі зразками без PEG. Але відмінність перестає бути істотною через 24 години експерименту.

#### 3.2.6.2 Дискодифузійний метод

Антимікробне тестування демонструє різний рівень антимікробної дії досліджуваних зразків залежно від виду штаму бактерій та складу полімерного розчину. Наприклад, більший антимікробний ефект під час тестування проти грамнегативних бактерій (*E. coli*) проявили волокна, що містять PEG, порівняно з волокнами без PEG (рис. 3.21).

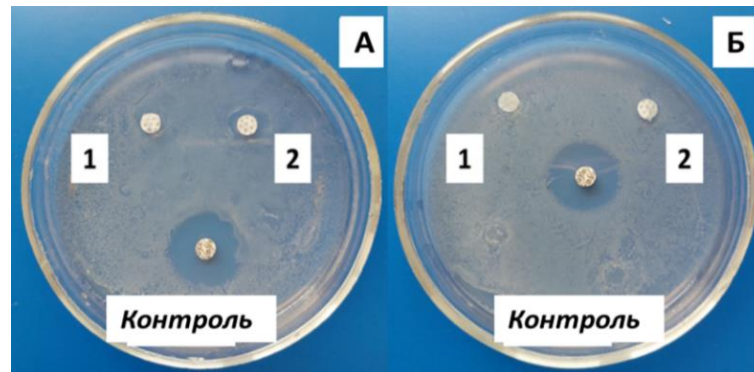


Рисунок 3.21 – Дискодифузійний метод: *E. coli* (А) та *S. aureus* (В)  
(1 – Ch/PLA та 2 – Ch/PLA-PEG)

Потрібно зазначити, що під час тестування порівняно з грампозитивними бактеріями (*S. aureus*) волокна Ch/PLA і Ch/PLA-PEG демонструють майже однаковий антимікробний ефект.

Втім, ці мінімальні відмінності в антибактеріальному ефекті між Ch/PLA і Ch/PLA-PEG стосуються тестування порівняно з грампозитивними бактеріями (*S. aureus*).

Ще варто зазначити, що зона інгібування, яка спостерігається, може бути невеликою, якщо антибактеріальний агент, такий як хітозан у зразку, не може ефективно дифундувати в агарове середовище.

### 3.2.6.3 Вивчення морфології бактеріальної біоплівки за допомогою SEM

Нашим дослідженням встановлено, що *S. aureus* – бактерія, яка має здатність продукувати позаклітинні полімерні речовини (ППР), створює щільну біоплівку. Ці утворені молекули ППР спроможні руйнувати різні полімерні сполуки, що сприяє відшаруванню поверхні [151]. Найвищу концентрацію полісахаридів у матриці біоплівки виявила мембрана, що була інкубована з *S. aureus* (рис. 3.22). З іншого боку, на мембранах Ch/PLA, так і на мембранах Ch/PLA-PEG, інкубованих *E. coli*, утворення біоплівки не було – спостерігалися лише декілька бактерій. У формуванні біоплівки топографія поверхні має велике значення, зокрема, «частка пористої області» і шорсткість, допомагають міграції

та адгезії бактерій до поверхні. Дієво зменшити проліферацію бактерій і зробити ризик утворення біоплівки мінімальним дозволяє додавання до полімерних розчинів Ch, що має антимікробні властивості.

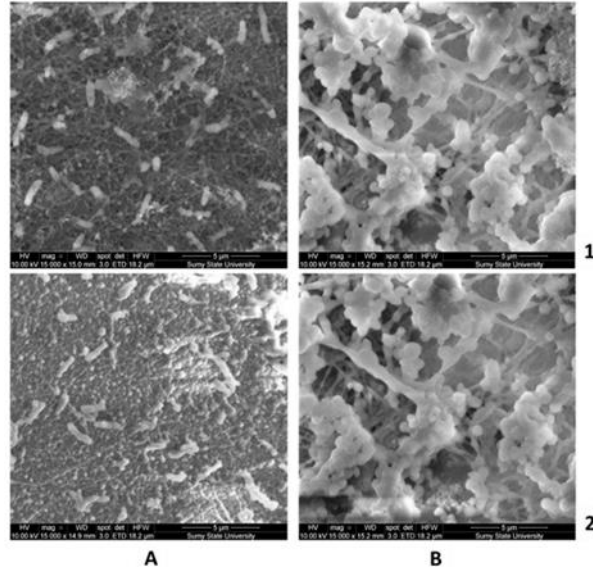


Рисунок 3.22 – SEM-зображення: 1 – Ch/PLA та 2 – Ch/PLA-PEG електропрядені мембрани після 24 годин співкультивування з бактеріальною суспензією *E. coli* (A) та *S. aureus* (B)

Узагальнюючи результати досліджень, можна зазначити, що мембрани з хітозану та полімолочної кислоти, вироблені методом електропрядіння, виявили високу ефективність інтермедіації процесу електропрядіння розчину. Додавання поліетиленгліколу (PEG) до розчину привело до покращання якості нановолокон, забезпечивши їм більш рівномірний розподіл діаметрів та збільшення гідрофільності. FTIR-аналіз підтвердив наявність характерних груп для всіх компонентів мембран, вказуючи на складну структуру. Додавання PEG незначно вплинуло на деградацію мембран, проте підвищило їх гідрофільність, зменшуючи контактний кут і покращуючи змочуваність поверхні.

Дослідження також показали, що мембрани з додаванням PEG виявили підвищену антибактеріальну активність проти *E. coli* та *S. aureus* порівняно з мембранами без PEG. Мембрани виявилися нетоксичними для клітин, а також продемонстрували підвищену антибактеріальну активність, особливо проти



*E. coli*. Хоча *S. aureus* створювала біоплівки на мембранах, зразки з *E. coli* цього не показали. Покращена гідрофільність та антибактеріальна властивість можуть набути застосування у виробництві біотехнологічних та медичних матеріалів із високою ефективністю.

Висновок полягає в тому, що мембрани, які містять PEG, виявилися більш привабливими для застосувань у біотехнології та медицині завдяки своїм покращеним характеристикам, включаючи гідрофільність та антибактеріальну активність.

### **3.3 Результати дослідження електропрядених мембран із хітозану та полімолочної кислоти, навантажених наночастинками срібла**

#### **3.3.1 Сканувальна електронна мікроскопія (SEM) та рентгенівська енергодисперсійна спектроскопія (EDX)**

Електропрядена мембрана, що була виготовлена, характеризувалася високою площею поверхні, пористістю до 16 %, малими розмірами пор (рис. 3.23). Морфологія волокон була однорідною, не містила потовщень, діаметри волокон варіювали від 70 нм до 700 нм, орієнтація волокон випадкова. У отриманих мембран спостерігалися зростання відношення площі до об'єму, збільшена гнучкість для поверхневих модифікацій, збільшення функціональності та кращі механічні властивості (включаючи жорсткість та міцність на розтяг), які забезпечувалися нанометровими діаметрами волокон. Вищезазначені властивості роблять із полімерних нановолокон ідеальних кандидатів для імітації структури позаклітинного матриксу [152]. Пориста та багаторівнева структура електропряденої мембрани була підтверджена вимірюванням поперечного перерізу.

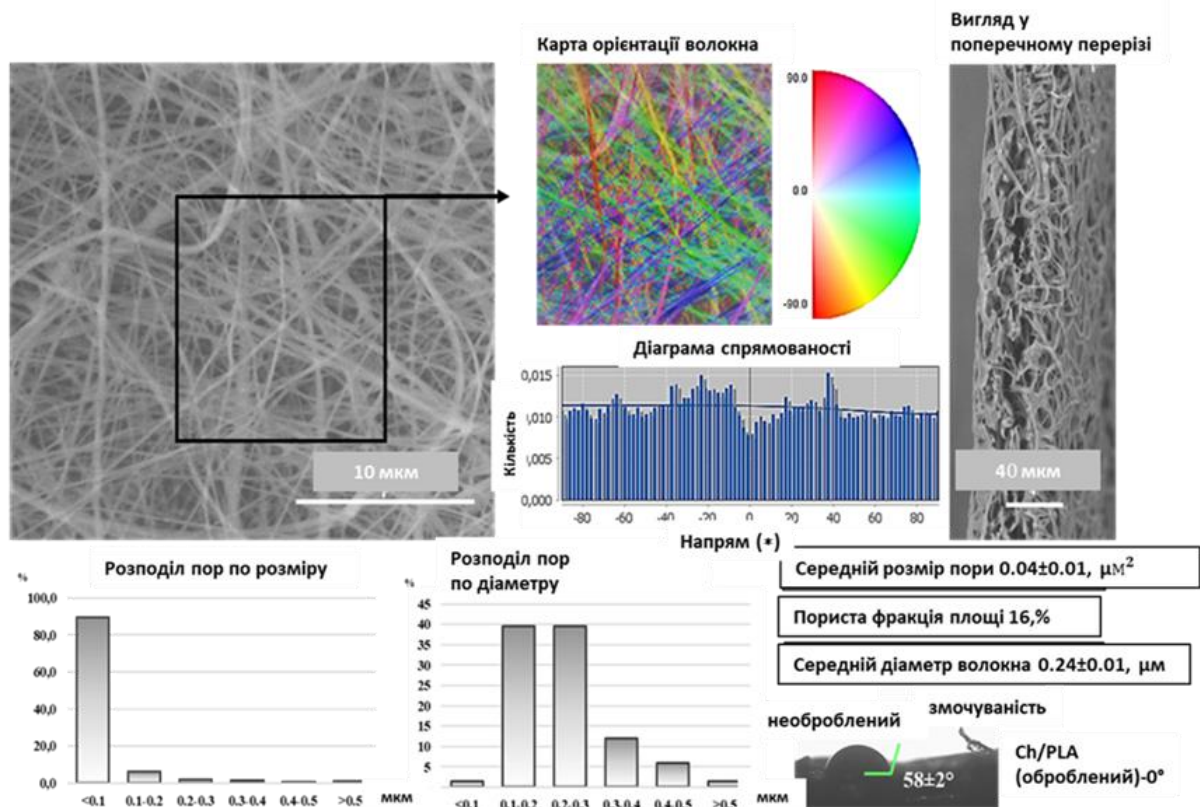


Рисунок 3.23 – Комплексне оцінювання морфологічних характеристик електропряденої мембрани

### 3.3.2 Характеристика змочуваності поверхні

Вагомим параметром для мембрани, що описує взаємодії між поверхнею мембрани та середовищем організму в живому організмі є вологість. Прикріплення клітин, їх проліферація та деградація мембран залежать певною мірою від вологості [153]. Зокрема, в мембранах, призначених для біомедичного використання в регенерації тканин (наприклад, загоєння ран та реконструкція тканин), проникність нановолокон мембрани є немалозначною фізичною властивістю. В цьому експерименті було отримано електропрядені Ch/PLA-мембрани з гідрофільним кутом контакту величиною  $58 \pm 2^\circ$ . Після оброблення нановолокон NaO контактний кут був зменшений ( $0^\circ$ ).

Аналізування EDX було зроблене для дослідження елементного складу мембрани. Модифікація наночастинками срібла не мала негативного впливу на морфологію поверхні мембрани (рис. 3.24). Аналізування EDX підтвердило наявність срібла після інкорпорування частинок. Найвища концентрація срібла

(0,25 ат. %) була виявлена в мембранах, які містили 400 мкг/мл AgNPs.

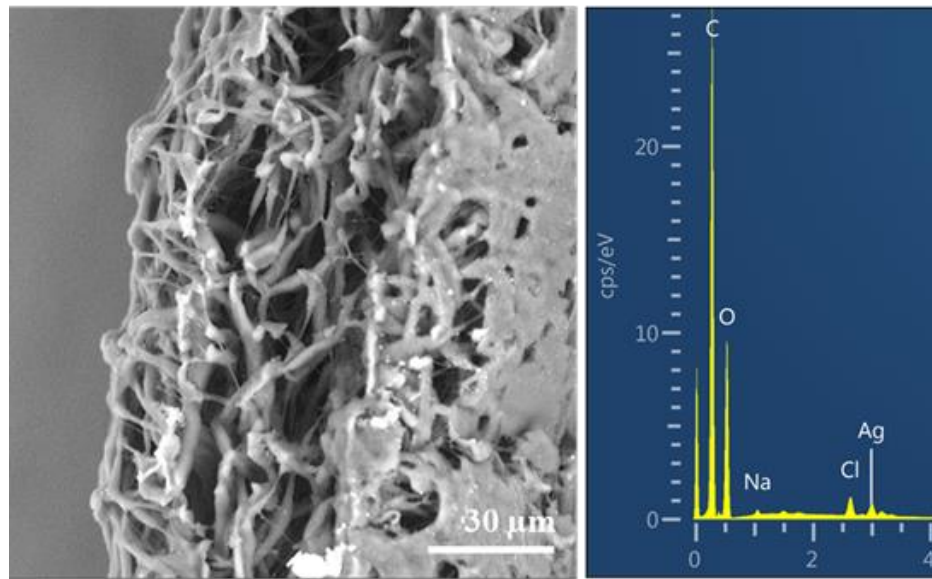


Рисунок 3.24 – Зображення поперечного перерізу мембран (сканувальної електронної мікроскопії з аналізом EDX, аналіз областей), навантажених 400 мкг/мл AgNPs

Результати досліджень свідчать, що мембрани потенційно можуть бути використані як матеріали для регенерації тканин [154]. Прикріплення та проліферацію клітин, засіяних *in vitro* на поверхнях мембран, забезпечується супергідрофільними властивостями [155].

### 3.3.3 Дослідження вивільнення іонів срібла з нановолокон модифікованих мембран

Згідно з результатами експериментів із вивільнення іонів срібла з нановолокон (рис. 3.25), отримані такі форми кривих, які демонструють типові динамічні характеристики для полімерних матриць, наповнених іонами металів [156]. Спостерігалось досить швидке початкове збільшення зображених функцій та їх подальший вихід на стабільне плато, це свідчить про те, що протягом двох годин більше ніж 90 % срібла було відділено від зразків. Це також підтверджує наявність значної частини іонів срібла у воді протягом перших кілька секунд

контакту зразків із водою. Висока подібність кривих доводить, що експерименти є винятково повторюваними, а процес вивільнення іонів не залежить від початкової концентрації срібла. Зокрема, була виявлена лінійна залежність кінцевої кількості виділеного срібла від його загальної кількості в зразку.

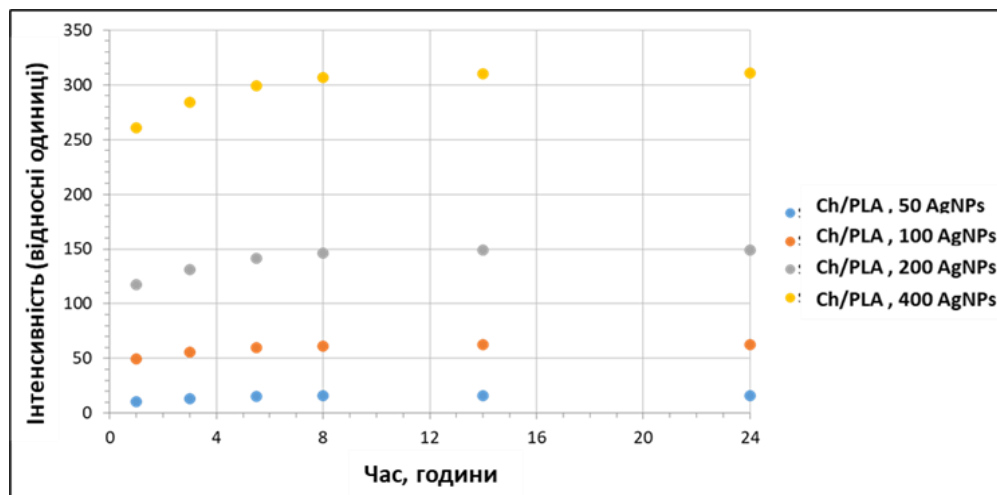


Рисунок 3.25 – Порівняння рівнів вивільнення іонів Ag мембран Ch/PCL-AgNPs у кожен часову точку експерименту

### 3.3.4 Оцінювання цитотоксичності та біосумісності мембран

Аналізування відновлення резазурину після п'ятиденного інкубування з UC MSC виявило залежність життєздатності клітин та активності їх проліферації від концентрації наночастинок срібла на мембрані Ch/PLA (рис. 3.26).

Значні токсичні ефекти на клітини спричинили мембрани Ch/PLA з концентраціями 400, 200 та 100 мкг/мл AgNPs. Важливо зауважити, що не було виявлено цитотоксичних ефектів при навантаженні срібними наночастинами мембран Ch/PLA в концентрації 12,5 мкг/мл, водночас це сприяло проліферації та адгезії клітин. Отримані результати демонструють високу біосумісність та проліферацію клітин для мембран Ch/PLA з концентрацією AgNPs 12,5 мкг/мл.

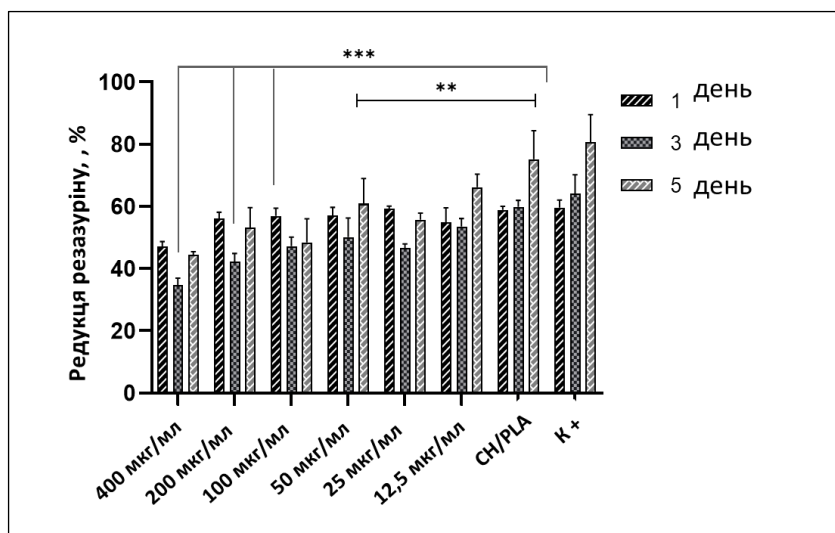


Рисунок 3.26 – Дані аналізу редукції резазурину щодо цитотоксичності мембран Ch/PLA, іммобілізованих різними концентраціями AgNPs протягом 5 днів експерименту з клітинною культурою. Ch/PLA – мембрана без наночастинок, кількість AgNPs, завантажених на Ch/PLA, наведена в мкг/мл.

Статистична значущість свідчить про відмінності між різними групами:

$$**p \leq 0,01, ***p \leq 0,001$$

### 3.3.5 Оцінювання антибактеріальної активності *in vitro*

У цьому дослідженні ретельно оцінювали мембрани хітозану для надання характеристики їх антибактеріальних властивостей, адгезивних властивостей та цитотоксичності, використовуючи різноманітні методи. Для визначення антибактеріальної ефективності мембран хітозану було використано класичний метод інокуляції живильного агару [157]. Крім того, застосовували тест на редукцію резазурину для дослідження антибактеріальних властивостей мембран та їх адгезивних характеристик [158]. Класичний метод дозволяє оцінити здатність мембран хітозану до інгібування росту бактерій у бульйоні [159], розкриваючи їх потенційні застосування щодо запобігання бактеріальним інфекціям [160]. Порівняно з цим тест на редукцію резазурину надає більш детальний аналіз антибактеріальних властивостей мембран хітозану та їх адгезивних здатностей [161]. Вищеперелічені методи дають змогу кількісно виміряти інгібування росту бактерій та зрозуміти адгезивні взаємодії мембран.

Комплексне оцінювання потенціалу матеріалу як антибактеріального агента та адгезивної поверхні забезпечується різнобічним підходом [162].

### 3.3.5.1 Швидкість бактеріальної редукції в динамічному контакті з бактеріальною культурою

Тест на редукцію резазурину продуктивно визначає ріст мікроорганізмів, причому немає необхідності у складних передекспериментальних обробках, таких як, наприклад, оброблення ультразвуком. Це особливо важливо, працюючи з ніжними мембранами, що легко пошкоджуються. Ми спостегігали зміни кольору з часом за різних концентрацій бактерій для вивчення взаємозв'язку між концентрацією бактерій та швидкістю метаболізму резазурину. Час інкубації було налаштовано на чотири години відповідно до динаміки росту досліджуваних мікроорганізмів. Одержані результати продемонстрували значний антибактеріальний ефект для мембран, що містили AgNPs, та мінімальний вплив для мембран без наночастинок срібла, що, ймовірно, пов'язано з власною антибактеріальною активністю хітозану. Тест на редукцію резазурину підкреслив вагомий антимікробний ефект мембран, інкорпорованих AgNPs, особливо очевидний за концентрацій наночастинок срібла 400 мкг/мл та 200 мкг/мл протягом усіх часових періодів експерименту (рис. 3.27).

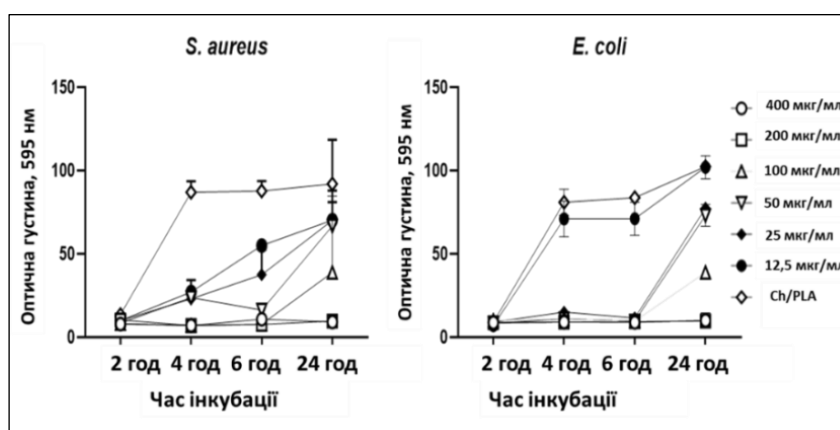


Рисунок 3.27 – Оцінювання антибактеріальних властивостей мембран Ch/PLA-AgNPs проти *S. aureus* та *E. coli*. Контроль – мембрана Ch/PLA без навантаження наночастинами; кількість наночастинок AgNPs, навантажених на Ch/PLA, виражена в мкг/мл

Одже, підвищена антимікробна активність підкреслює антимікробний потенціал мембран, функціоналізованих AgNPs. Проте, починаючи з концентрації 100 мкг/мл після 24 годин спільної інкубації, зразки, які випробували, втрачали свою активність. Цікаво, що 50 мкг/мл та 25 мкг/мл наночастинок забезпечували більш виражений антибактеріальний ефект на *E. coli*, ніж на *S. aureus* протягом 6 годин експерименту. Зразки, що містять 12,5 мкг/мл AgNPs, показали подібну антимікробну динаміку, як і не навантажені наночастинок Ch/PLA-мембрани, для *E. coli*, але сильнішу для *S. aureus*.

### 3.3.5.2 Антиадгезивні властивості методом посіву на живильний агар

Упродовж експерименту спостерігали значне зменшення популяції бактерій *S. aureus* та *E. coli* залежно від дози AgNPs до 6-ї години експерименту (рис. 3.28).

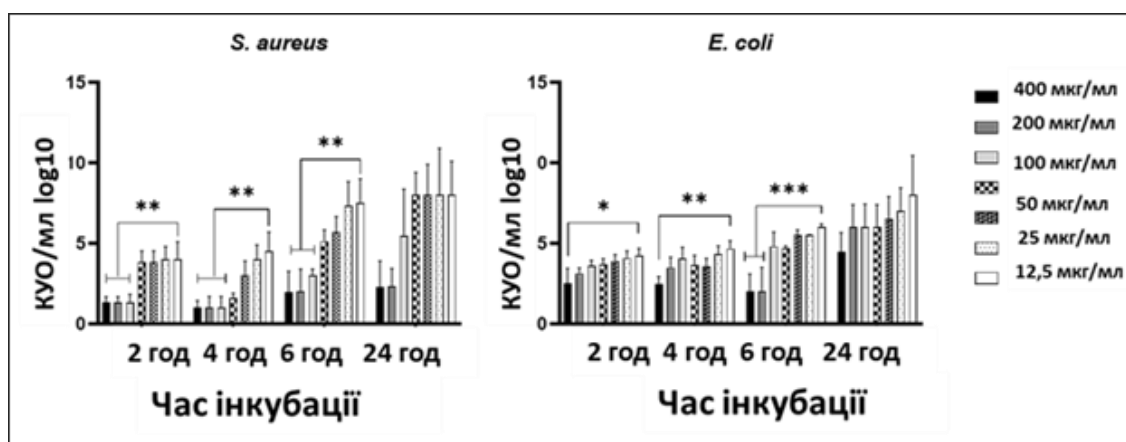


Рисунок 3.28 – Антиадгезивні властивості нановолокнистих мембран Ch/PLA, збагачених срібними наночастинками проти утворення біоплівки *S. aureus* та *E. coli*. Ch/PLA-мембрана без навантаження наночастинками; кількість наночастинок AgNPs, збагачених Ch/PLA, виражена в мкг/мл;

\* – позначають достовірні відмінності між групами:

\*p ≤ 0,05; \*\*–p ≤ 0,01; \*\*\*–p ≤ 0,001

Більше того, динаміка зменшення загальної кількості обох штамів бактерій залежно від часу в разі інкубації зі зразками, навантаженими 100 мкг/мл, 200 мкг/мл та 400 мкг/мл наночастинок, проти *S. aureus* була очевидною. Одже, до 6-ї години співкультивування з мембранами, інкорпорованими від 100 до 400 мкг/мл AgNPs, антиадгезивна здатність зразків, які тестували, була вищою щодо *S. aureus*. Варто відмітити, що менші концентрації доданих наночастинок (50, 25 та 12,5 мкг/мл) не показали значної відмінності в активності проти біоплівки залежно від типу бактерій.

Завдяки дослідженню було доведено, що хітозан впливає на грамнегативні бактерії більшою мірою, ніж на грампозитивні, що пов'язано з їх вищою гідрофільністю [163], [164]. Підтверджуючи висновки інших дослідників, виявлено, що додавання срібла до нановолоконних мембран покращує їх антибактеріальну ефективність як проти грампозитивних, так і грамнегативних бактерій. Антибактеріальні властивості хітозану та срібних наночастинок підтримуються спільним механізмом дії, який активується за допомогою механізмів срібних наночастинок, таких як пошкодження цілісності мембрани, що призводить до витоку внутрішньоклітинного вмісту [165], [166].

Дослідження формування біоплівки за допомогою SEM дозволило візуалізувати ефективність волокон як антиадгезивних структур проти бактеріальних штамів (рис. 3.29).



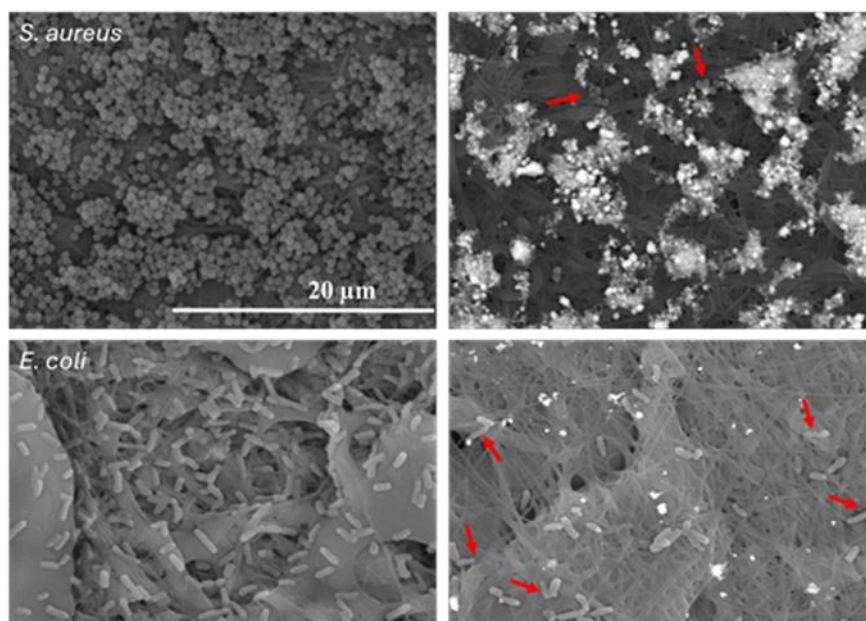


Рисунок 3.29 – SEM-зображення контрольних нановолокнистих Ch/PLA-мембран (правий стовпчик) та Ch/PLA-мембран, навантажених срібними наночастинками – 200 мкг/мл AgNPs (лівий стовпчик), після 24 годин спільного інкубування із *S. aureus* та *E. coli*

Контрольна Ch/PLA-мембрана не мала виражених антиадгезивних властивостей після 24 годин спільного інкубування. Зображення з електронного мікроскопа показали формування бактеріальної біоплівки вздовж волокон для обох штамів. Особливо помітне плавлення волокон спостерігалось для штамів *E. coli*, що свідчить про їх здатність розкладати PLA [167]. Однак додавання нанорозмірних антибактеріальних речовин може змінювати й покращувати властивості полімерних мембран. Мембрани Ch/PLA в поєднанні з AgNPs проявили антибактеріальний ефект через опір адгезії та росту бактерій. Волокна Ch/PLA, що містили 200 мкг/мл наночастинок срібла, показали пригнічення росту біоплівки обох штамів. Для штамів *E. coli* були наявні лише невеликі групи бактерій, тоді як бактерії *S. aureus* візуалізувалися окремими клітинами. Обидва типи бактерій зазнали впливу, що проявилось змінами в морфології, такими як ознаки лізису й порушена клітинна стінка, більшість із яких зменшилися в розмірі або змінили свою форму.

Поступова деградація хітозану з часом обумовлюється його повільним

розпадом та утворенням коротких олігомерів із нановолокон, що забезпечує антимікробну ефективність. Це досягається шляхом порушення мембран бактеріальних клітин, зміною проникності клітин та утрудненням важливих клітинних процесів, що, зрештою, перешкоджає проліферації бактерій. Крім того, біодеградація та біосумісність хітозану додатково підвищують його придатність як антимікробного засобу та носія для доставки ліків [168]. Отже, інтеграція AgNPs в Ch/PLA-мембрани за концентрації 50 мкг/мл ефективно стримувала ріст обох видів бактерій на ранніх етапах інкубації, але знижувала ефективність через 24 години експерименту.

Оптимізація концентрації срібних наночастинок у мембранах є ключовою для забезпечення ефективної антимікробної дії проти бактерій та мінімізує потенційну шкоду для епітеліальних клітин у рані. Дослідження доводять, що токсичність, пов'язана з AgNPs, переважно зумовлена вивільненням іонів срібла, а не дією самих наночастинок. Однак потрібно обережно інтерпретувати результати *in vitro* експериментів, оскільки вони можуть не повністю відображати складні взаємодії, що відбуваються в середовищі рани, яке включає кілька типів клітин та шарів [169].

Іони срібла можуть утворювати неактивні сполуки під час взаємодії з рановим ексудатом, зменшуючи ризик токсичності. Крім того, AgNPs мають тенденцію до агрегації в фізіологічних умовах, що обмежує їх проникнення в глибокі шари шкіри та зменшує ймовірність системного впливу. Є свідчення, що срібні наночастинок в пов'язках переважно націлюються на бактерії біля поверхні рани, мінімізуючи їх вплив на глибші тканини.

Матеріали, інкорпоровані AgNP, сприяють загоєнню ран шляхом модуляції активності металопротеаз, ключових ферментів ремоделювання тканин. AgNPs допомагають знешкоджувати бактеріальні клітини, пригнічувати запальний процес та модулювати рівні цитокінів, регулюючи рівні металопротеаз, таким чином запобігаючи пошкодженню тканин [170], [171].

Базуючись на цих результатах, дієві стратегії зниження потенційної токсичності AgNPs передбачають контроль за їх швидкістю вивільнення та

оптимізації концентрації в мембранах. Таким чином, уведення оптимальної кількості AgNPs у нановолокнисті мембрани може забезпечити ефективну антимікробну дію, сприяючи загоєнню ран та регенерації тканин.

### 3.4 Експериментальне дослідження на лабораторних тваринах

#### 3.4.1 Планіметричне дослідження ранових поверхонь

Макроскопічні зображення ранових дефектів у динаміці ранового загоєння подані на рисунку 3.30.



Рисунок 3.30 – Макроскопічні зображення ранових дефектів у різні часові проміжки експерименту

Загоєння ран було кількісно оцінено вимірюванням площі ран. Закриття та відновлення рани залежало від типу лікування (рис. 3.31). На 1-й день шкірні дефекти демонстрували типові ознаки гнійної рани, перші ознаки очищення від патологічного детриту з'явилися з 5-го до 6-го дня у групах PLA з хлоргексидином і Ch/PLA з AgNPs та з 8-го дня у тварин, яким використовували Ch/PLA-мембрани. Швидкість закриття рани була вищою в групах із Ch/PLA з AgNPs і в мембран PLA-хлоргексидин порівняно з лікуванням лише Ch/PLA-

мембраною. Примітно, що епітелізація була зареєстрована на 15-й день у щурів із Ch/PLA-мембранами, модифікованими AgNPs, та у 2 мембран PLA-хлоргексидин і на 17-й день у групі тварин, яким накладали Ch/PLA-мембрани. Морфометричний аналіз загоєння ран показав, що гнійне запалення призвело до збільшення площі рани до 4-го дня експерименту. Ми не виявили достовірної відмінності в динаміці площі рани щодо варіантів лікування до 9-го дня у Ch/PLA-мембран без срібла і модифікованих наночастинками. Однак, починаючи з 10-го дня, було зареєстровано значне прискорення закриття ран у групі з мембраною PLA-хлоргексидин і Ch/PLA з AgNPs. Крім того, у щурів, оброблених із мембраною PLA з хлоргексидином, раніше спостерігалася епітелізація рани на 15-й день, тоді як у решти тварин повне закриття ран спостерігалася з 18-го дня.

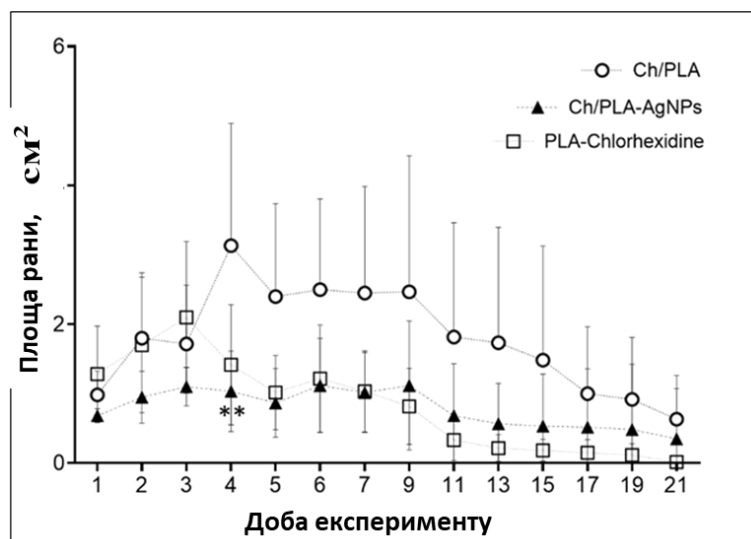


Рисунок 3.31 – Динаміка зменшення площі рани в експериментальних тварин залежно від виду застосованого лікування; \* – позначають достовірні відмінності між групами за \*\*– $p \leq 0,01$

### 3.4.2 Мікробіологічне дослідження ранового ексудату

Мікробіологічний профіль експериментальних гнійних ран показав, що застосоване лікування призвело до ліквідації бактерій із 4–6-го днів залежно від типу бактерій (рис. 3.32). Використання всіх досліджених методів лікування

призвело до максимального зниження рівня бактеріальної колонізації ран до 7-го дня після початку лікування. Проте модифікація мембран AgNPs забезпечувала більш ефективне усунення бактерій – значні відмінності між групами були виявлені на 5-й та 7-й дні – відповідно для *E. coli* та *S. aureus* зниження кількості бактерій відбулося до 5 log КУО/мл та 4 log КУО/мл при використанні Ch/PLA-AgNPs зразків та для *P. aeruginosa* до 5 log КУО/мл та 4 log КУО/мл відповідно. Потрібно зазначити, що ерадикація *E. coli* в зазначені терміни відбувалася майже на одному рівні в разі використання навантажених наночастинками срібла зразків і контрольного зразка з хлоргексидином (знижуючи мікробне навантаження до 5 log КУО/мл та 4 log КУО/мл відповідно). На 14-ту добу Ch/PLA-AgNPs-мембрани продемонстрували вищу активність порівняно зі зразками PLA-хлоргексидин щодо грамнегативних бактерій (відбулося повне звільнення ранової поверхні від *P. aeruginosa*).

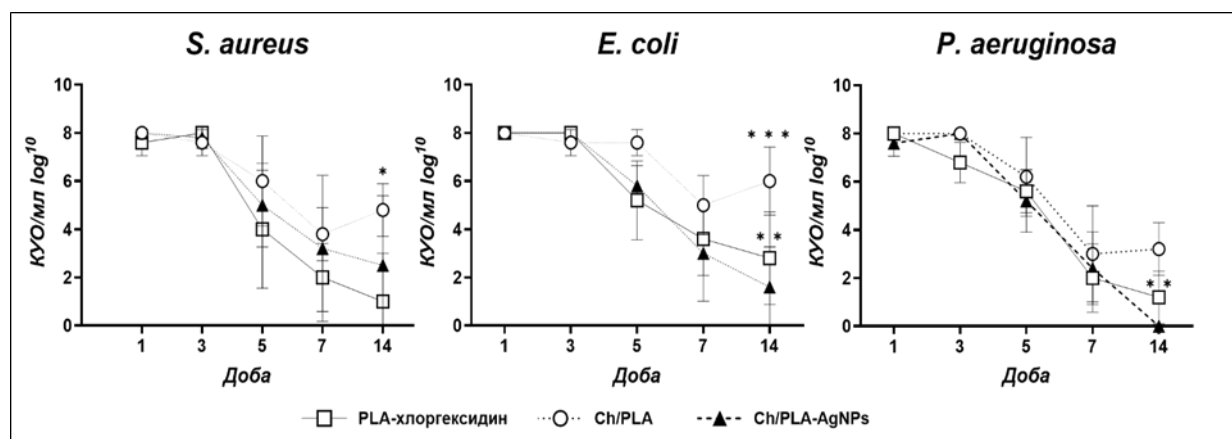


Рисунок 3.32 – Динаміка мікробної колонізації ран в експериментальних тварин залежно від виду застосованого лікування; \* – позначають достовірні відмінності між групами за  $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$ ;  $***p \leq 0,001$

### 3.4.3 Гістологічне та імуногістохімічне дослідження

У групі тварин, яким проводили лікування зразками PLA-хлоргексидин, на 3-тю добу спостереження була виявлена шкіра за наявності ранового дефекту, наповнена некротизованими тканинами, відмежованими «запальним валом» із нейтрофілів та лімфоцитів, наявні нерівномірні плями, насичено забарвлені



гематоксиліном (гематоксилінові тільця) (рис. 3.33). У рановому детриті були наявні залишки використаного біоматеріалу та рановий «струп». Тканини стінки й дна рани містили незрілу грануляційну тканину з дифузною запальною інфільтрацією. Дном рани була гіподерма (сітчастий шар дерми) з поширенням запального інфільтрату між волокнами сполучної тканини. Також були виявлені в тканинах шарів шкіри набряк, ознаки ексудації.

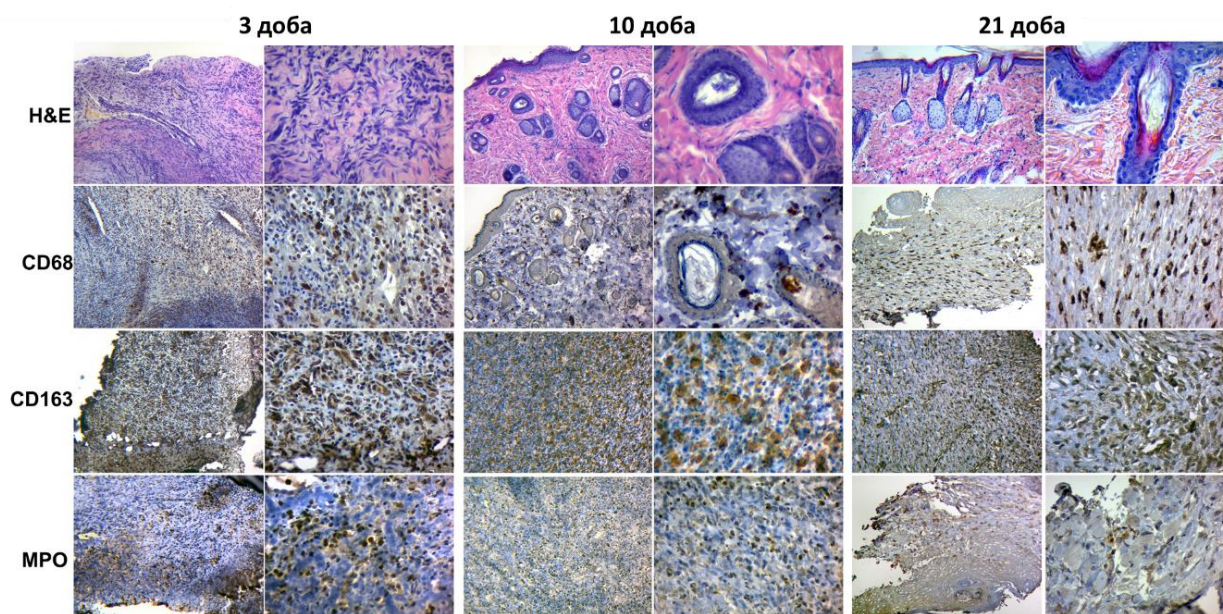


Рисунок 3.33 – Гістологічна будова ділянки гнійної рани щурів та імуногістохімічні маркери (зabarвлення: гематоксилін-еозин), яким використовували мембрани PLA-хлоргексидин. Збільшення x100 (ліві стовпчики) та x400 (праві стовпчики)

На 10-ту добу в рановому дефекті було виявлено значну кількість грануляційної тканини різного ступеня зрілості, дифузну запальну лімфогістіоцитарну інфільтрацію. Запальний інфільтрат містив домішки нейтрофілів, що свідчить про активність запального процесу, та поширювався в прилеглі до ранового дефекту тканини шкіри. Наявні численні нейтрофіли з ознаками дегрануляції, які складали «зовнішній кордон» ранового процесу.

На 21-шу добу рановий дефект був заміщений фіброзною тканиною з переважно легкою дифузною запальною змішаноклітинною інфільтрацією.

Окремі зразки мали більш виражене запалення зі збереженням зрілої грануляційної тканини з помірною запальною реакцією. У запальному інфільтраті переважали лімфоцити з поодинокими макрофагами, плазмоцитами, нейтрофілами. Між сполучнотканинними волокнами ми виявили гемосидерофаги (макрофаги, заповнені бурувато-золотистим пігментом гемосидерином, вони свідчать про крововиливи у минулому). Зразки мали кращий вигляд унаслідок меншого рівня запальної інфільтрації, необхідно відмітити помірний (але виражений) рівень фібротизації дерми та заміщеної тканини рани. Також відмічали помірний набряк усіх шарів шкіри.

В групі щурів, яким використовували мембрани з Ch/PLA, модифіковані AgNPs, на 3-тю добу тканина шкіри в ділянці ранового дефекту містила помірну кількість некротизованого детриту, помірно виражену фібринозно-гнійну ексудацію та нейтрофільну запальну інфільтрацію (рис. 3.34).

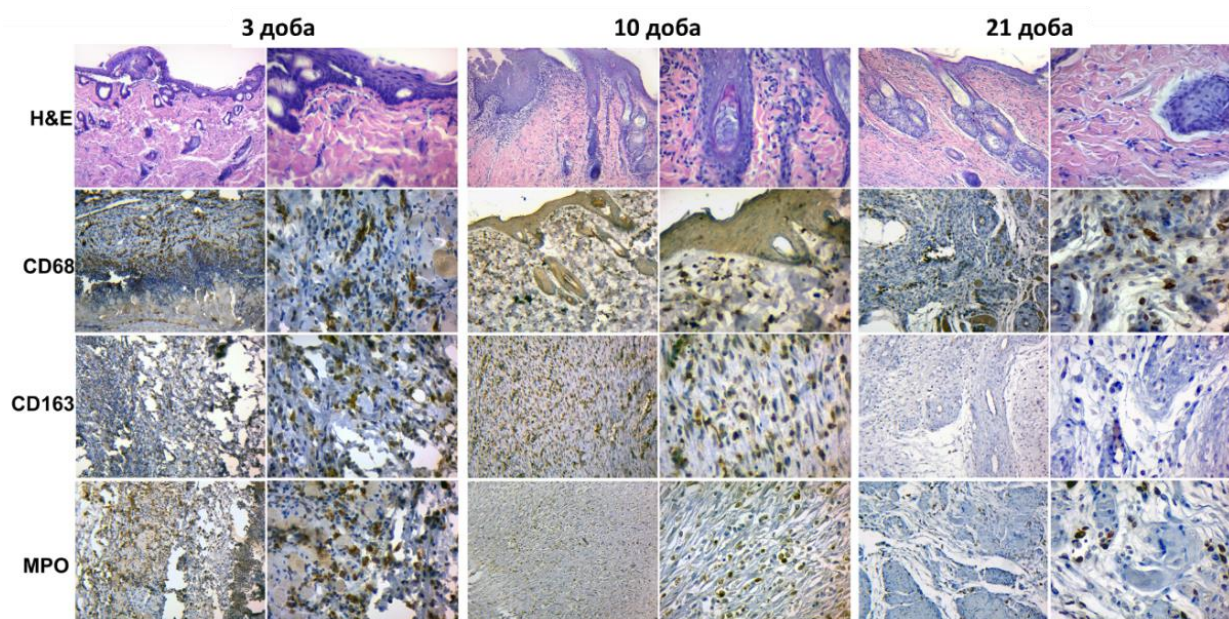


Рисунок 3.34 – Гістологічна будова ділянки гнійної рани щурів та імуногістохімічні маркери (зabarвлення – гематоксилін-еозин), яким використовували мембрани Ch/PLA, модифіковані AgNPs. Збільшення x100 (ліві стовпчики) та x400 (праві стовпчики)

У тканині рани ми відмічали розвиток незрілої грануляційної тканини з

помірною запальною інфільтрацією та залишками біоматеріалу пов'язки. Патогістологічні ознаки запальної ексудації та набряку були виражені помірно.

На 10-ту добу ранові тканини переважно склалися зі зрілої грануляційної тканини. У рані була наявна мінімальна запальна інфільтрація змішаного лімфогістіоцитарного складу. Ми відмічали незначні явища набряку та фібротизації (склерозування, збільшення кількості сполучнотканинних волокон) дерми. У суміжних тканинах були наявні великі зернисті клітини неправильної форми, що можуть відповідати нейтрофілам у стані дегрануляції або активованим фібробластам.

На 21-шу добу тканини шкіри в межах моделювання ранової інфекції та її лікування характеризувалися фіброзними змінами з незначною запальною інфільтрацією. Запальний інфільтрат був представлений поодинокими клітинами та групами лімфоцитів. Тканини шкіри містили повнокровні судини, наявний був помірний їх набряк. Більшість зразків мали односпрямовані позитивні зміни, за невеликим винятком із залишками зрілої грануляційної тканини та помірною запальною інфільтрацією.

В групі тварин, яким використовували Ch/PLA-мембрани, на 3-тю добу рани були заповнені некротизованим детритом та залишками матеріалу пов'язки, обмеженим нейтрофільним валом запальної інфільтрації (рис. 3.35).

Дном рани була переважно гіподерма (сітчастий шар дерми). У прилеглих до ранового дефекту тканинах виявлявся інтерстиціальний набряк усіх шарів шкіри, які проявлялися порожнинами між волокнистим компонентом дерми, придатками шкіри (волосяні фолікули, сальні залози). Прилеглий до рани епідерміс мав ознаки дистрофічних змін покривного епітелію.

На 10-ту добу тканина ранового дефекту шкіри містила грануляційну тканину різного ступеня зрілості з ознаками запальної інфільтрації та явищами набряку, дистрофічними змінами покривного епітелію епідермісу, прилеглого до рани. Ми виявили, що запальний процес проявлявся у вигляді дифузного неінтенсивного запального інфільтрату, який поширювався між волокнами дерми шкіри і в якому переважали лімфоцитами та гістіоцитами з домішками



фіброblastів. Усі тканини шкіри містили ознаки набряку та дисциркуляторних розладів.

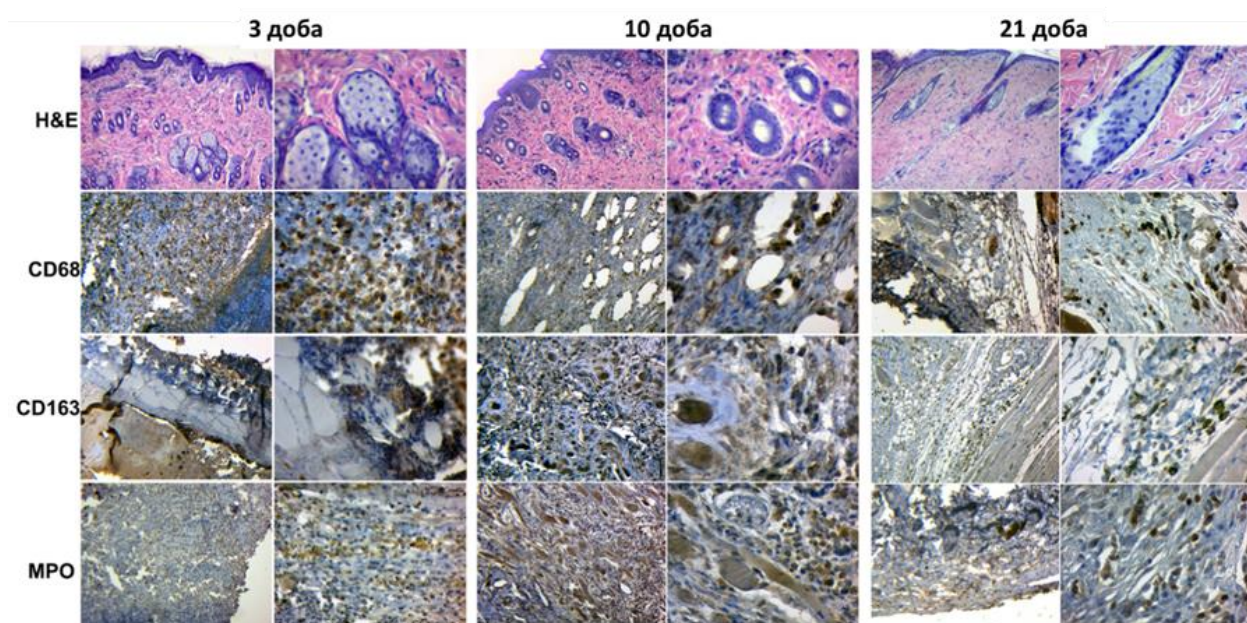


Рисунок 3.35 – Гістологічна будова ділянки гнійної рани щурів та імуногістохімічні маркери (зabarвлення – гематоксилін-еозин), яким використовували мембрани Ch/PLA. Збільшення x100 (ліві стовпчики) та x400 (праві стовпчики)

На 21-шу добу в цій групі тварин були наявні тварини з різною реактивністю на експеримент. В одному зі зразків були виявлені явища запалення, реакція з хронізацією процесу, в іншому зразку було визначене незначне запалення, але виражені фіброзні зміни з тенденцією до хронічного проліферативного запалення. В цих зразках шкіра з явищами набряку всіх шарів, на фоні якого відмічалось огрубіння колагенових та еластичних волокон та гладеньких міоцитів сосочкового шару, оптично порожні простори навколо волосяних фолікулів і сальних залоз шкіри. Тканина шкіри містила значну кількість сполучної тканини, залишки зрілої грануляційної тканини зі слабкою, але дифузною запальною інфільтрацією. У запальному інфільтраті переважали лімфоцити та гістіоцити. Проте в деяких зразках було виявлене гарне відновлення, мінімальні зміни, наявний набряк тканини, поодинокі незначні

запальні інфільтрати. Також були зразки з вираженими змінами, значною кількістю зрілої грануляційної тканини з активним хронічним лімфогістіоцитарним запальним інфільтратом – переважають лімфоцити з гістіоцитами, але наявні нейтрофіли, гематоксилінові тільця.

Результати імуногістохімічних досліджень подані на рисунку 3.36.

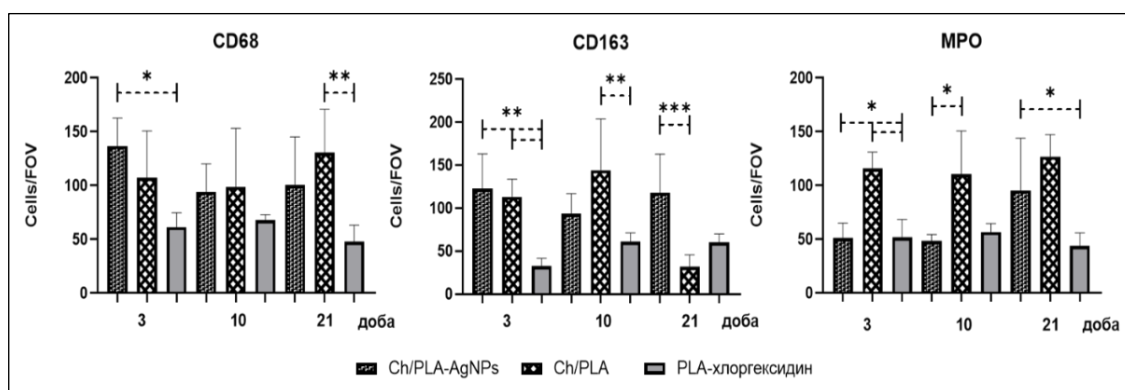


Рисунок 3.36 – Показники маркерів імуногістохімічного дослідження в різні терміни дослідження. \* – позначають достовірні відмінності між групами за

\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

Достовірні відмінності були визначені в рівнях усіх досліджених маркерів на 3-тю добу експерименту в разі застосування Ch/PLA-AgNPs- мембран та PLA-хлоргексидиновмісних зразків. Також для всіх імуногістохімічних маркерів на 10-ту добу спостереження найвищі показники були встановлені для Ch/PLA-мембран. Проте на 21-шу добу лише рівень CD163 був достовірно нижчим ( $p < 0,001$ ) порівняно з Ch/PLA-AgNPs.

На 3-тю добу експерименту спостерігали найвищу активність макрофагів (CD68) у зразках Ch/PLA-AgNPs, що свідчило про значний запальний процес на протипагу до зразків PLA-хлоргексидин. Високий рівень клітин CD163 у зразках Ch/PLA-AgNPs та Ch/PLA свідчить про активний запальний процес та очищення тканин, тоді як найменша кількість клітин CD163 у зразках PLA-хлоргексидин свідчить про більш повільну імунну відповідь. Найвищий показник MPO у зразках Ch/PLA свідчить про протизапальну відповідь, тоді як у зразках Ch/PLA-AgNPs та PLA-хлоргексидин показники MPO менші більше ніж удвічі, що

свідчить про активацію нейтрофілів.

На 10-ту добу спостерігалось зменшення кількості клітин CD68 у зразках Ch/PLA-AgNPs та Ch/PLA, що свідчило про зниження запалення, тоді як у зразках PLA-хлоргексидин кількість клітин CD68 збільшувалася, вказуючи на наявність запалення та інфекції. Збільшення клітин CD163 у зразках Ch/PLA та PLA-хлоргексидин свідчить про активний запальний процес та активацію фагоцитозу. Показники MPO на 10-й день значно не змінюються, що свідчить про продовження протизапальної відповіді та мінімізацію тканинного пошкодження.

На 21-шу добу незначне підвищення кількості клітин CD68 у зразках Ch/PLA-AgNPs свідчить про регенеративні процеси, тоді як значне підвищення клітин CD68 у зразках Ch/PLA свідчить про затримку загоєння та зміни в імунній відповіді. Зменшення клітин CD68 у зразках PLA-хлоргексидин свідчить про зменшення запалення та загоєння рани. Незначне підвищення клітин CD163 у зразках Ch/PLA-AgNPs засвідчує активну тканинну регенерацію, тоді як значне зниження клітин CD163 у зразках Ch/PLA свідчить про затримку загоєння та дисбаланс в імунній відповіді. У зразках PLA-хлоргексидин стабільний рівень клітин CD163 свідчить про зменшення запалення та регенерацію тканин. Показники MPO в зразках Ch/PLA-AgNPs збільшуються більше ніж удвічі, що свідчить про протизапальну відповідь, ремоделювання тканин та їх загоєння, тоді як у зразках Ch/PLA збільшення MPO свідчить про продовження протизапальної відповіді, а незначне зниження MPO в зразках PLA-хлоргексидин свідчить про погіршення тканинного відновлення.

Результати досліджень свідчать про те, що електропрядені мембрани Ch/PLA з наночастинками срібла мають високий потенціал для використання в регенерації тканин завдяки своїм фізико-хімічним властивостям, включаючи високу пористість, гідрофільність та антибактеріальну активність. Вони сприяють прикріпленню та проліферації клітин, що робить їх перспективними для біомедичного застосування, зокрема, для лікування ран та запобігання бактеріальним інфекціям. Завдяки високій пористості, ці мембрани можуть

забезпечити достатній обмін газами та живильними речовинами, що сприяє швидшому загоєнню ран. Гідрофільність мембран сприяє утриманню вологи, що важливо для процесів регенерації тканин, оскільки вологе середовище підтримує активність клітин та ферментів, що беруть участь у загоєнні ран. Антибактеріальна активність мембран, навантажених наночастинками срібла, ефективно запобігає інфікуванню ран, знижуючи ризик ускладнень та сприяючи швидкому одужанню пацієнтів.

Оптимізація концентрації AgNPs є ключовою для забезпечення ефективної антибактеріальної дії та мінімізації потенційної цитотоксичності. Висока концентрація наночастинок срібла може спричиняти токсичні ефекти на клітини, тому важливо визначити оптимальну кількість AgNPs, яка забезпечить максимальну антибактеріальну активність без негативного впливу на клітинну проліферацію та життєздатність. Дослідження показали, що мембрани з концентрацією 100 мкг/мл AgNPs є найбільш оптимальними для використання в біомедичних застосуваннях, оскільки вони не лише мають високу біосумісність, а й ефективно інгібують ріст бактерій.

Загалом електропрядені мембрани Ch/PLA з наночастинками срібла являють собою перспективний матеріал для регенерації тканин та лікування ран завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям. Подальші дослідження можуть бути спрямовані на вивчення довготривалих ефектів застосування таких мембран, а також на розроблення нових методів їх модифікації для покращання біосумісності та функціональних характеристик.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Хітозан завдяки своїм біосумісним, біодеградабельним та антимікробним властивостям привертає значну увагу в галузі біомедичних застосувань. Електропрядені нановолокнисті мембрани з хітозану є перспективними матеріалами для використання в тканинній інженерії, ранових пов'язках та системах доставки ліків. Однак механічні та біологічні властивості цих мембран можуть істотно залежати від методу нейтралізації, застосовуваного після електроспінінгу [172].

Ми використовували основні методи нейтралізації хітозанових мембран: нейтралізацію лужними розчинами NaOH, нейтралізацію розчинами солей Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Кожний із цих методів впливає на морфологію, механічні властивості та біологічну поведінку хітозанових мембран по-різному.

Лужна нейтралізація сприяє збереженню структурної цілісності нановолокон, проте можуть виникати незначні зміни в діаметрі волокон. Лужні розчини можуть також призводити до утворення мікротріщин на поверхні мембрани. Цей метод забезпечує високу механічну міцність мембран, але іноді спостерігається їх крихкість. Проте лужна нейтралізація може призводити до підвищеної цитотоксичності через залишки лугу, що потребує ретельного промивання мембран [173].

Електроропрядені мембрани з Ch-TFA/DCM забезпечували бактеріостатичний ефект на планктонні бактерії та їх біоплівки. Швидкість зменшення бактерій була вищою для нановолокон, виготовлених за допомогою розчинників TFA/DCM 7:3 через уведення атомів фтору в основу полімерного ланцюга хітозану. Крім того, результати тестів свідчать про те, що морфологічні властивості електропрядених волокон можуть контролювати утворення біоплівки на нановолоконних мембранах. Незважаючи на те, що оброблення лугом NaOH призводить до збільшення діаметра волокон унаслідок їх набряку, воно зберігає нановолокнисту структуру мембрани [174]. Досліджувані матеріали здатні інгібувати ріст обох тестових мікроорганізмів упродовж 6

годин, що свідчить про їх вищий потенціал проти адгезії та застосовність для антимікробних застосувань. Проте обидва склади мембран були більш ефективними проти *E. coli*, а постоброблення водним розчином NaOH надало найбільш помітного ефекту [175].

Морфологія волокон та середній діаметр, а також пористість мембран впливають на проліферацію бактерій. Бактерії легше прикріплювалися до волокон із діаметром, подібним до розміру бактерій [176]. Розмір пор в електророзпилених мембранах Ch-TFA/DCM був меншим, ніж розмір мікроорганізмів, що запобігало проникненню бактерій та росту мікроорганізмів. Крім того, форма бактерій також впливала на адгезію: круглі *S. aureus* демонстрували вищу адгезію та ріст, ніж паличкоподібні *E. coli*. Волоконні структури обмежують процес колонізації, що призводить до конформаційних змін у паличкоподібних бактерій та спричинення смерті клітин. Відповідно оцінювання антибактеріальної та антибіоплівкової активності підтверджує антибактеріальну стійкість електропрядених мембран хітозану, виготовлених з обох дослідних розчинів на одному рівні, незважаючи на тип оброблення. Дослідження з FT-IR показали, що застосування розчинників TFA/DCM у різних співвідношеннях впливає на хімічну структуру хітозану завдяки збільшенню кількості протонуваних груп  $\text{NH}_3^+$ , що демонструється вищою інтенсивністю смуг та їх зміщенням до нижніх довжин хвиль [177]. Крім того, ми довели, що кислота реагує з полімером, утворюючи ковалентні зв'язки (амідні зв'язки), це впливає на адгезію та морфологію волокна. Цей ефект також може бути пов'язаний із включенням груп  $\text{CF}_3$ , виявлених у спектрі FT-IR. Зміна хімічної структури була більш помітною для зразка, підготовленого з використанням співвідношення 9:1 TFA/DCM, через більшу кількість реактивних груп кислоти ( $-\text{COOH}$ ,  $\text{CF}_3$ ) та їх вищу доступність [178].

Хоча матеріали на основі хітозану мають потенціал антибактеріальної дії, властивості, що залежать від часу впливу, показали, що співвідношення розчинників обмежує антибактеріальну ефективність. Співвідношення розчинників у розчині хітозану впливає на антибактеріальні властивості

тестових зразків на грампозитивні та грамнегативні бактерії по-різному: мембрани Ch-TFA/DCM 9:1 показали кращі антиадгезивні властивості порівняно з мембранами Ch-TFA/DCM 7:3. Ми виявили також вищу антиадгезивну ефективність проти *E. coli*, підтверджену зображеннями SEM. Такі явища можуть бути пояснені тим, що ТФА утворює хімічні зв'язки з хітозаном. Через це полімерний ланцюг отримує флуоровані атоми, які зменшують гідрофільність хітозану, водночас утруднюючи адгезію бактерій [179].

Бактерії координують свою поведінку завдяки секреції молекулярних сигналів (Quorum Sensing) як механізм виживання для сприяння перетворенню з планктонного стану на біоплівковий [180]. Біоплівковий стан має стійкість, що захищає бактерії від антибіотиків. Антибіоплівкові молекули, виділені з природних джерел, виявляють антимікробну активність шляхом нейтралізації та руйнування ліпополісахаридів або зміни потенціалу мембрани чи проникності мембрани [181]. Іони  $\text{NH}_3^+$  хітозану взаємодіють із бактеріями, які мають негативний заряд (у грампозитивних бактерій через наявність тейхоєвих кислот і через ліпополісахариди в клітинній стінці грамнегативних бактерій), водночас заважаючи їх проникненню (рис. 4.1). Зразки, що містили більшу кількість ТФА, виявили більший антимікробний ефект хітозану [182]. Такі мембрани зменшували мікробний ріст обох мікроорганізмів на початкових етапах інкубації, але не були ефективними після 8 годин. Це може бути пов'язано з часовою залежністю розпаду хітозану та вивільнення олігомерів із нановолокон, що дозволяє реалізувати антимікробний ефект хітозану через зміну проникності клітин, руйнування клітинної мембрани та проникнення олігомерів у клітину, що призводить до інгібування транскрипції [183].



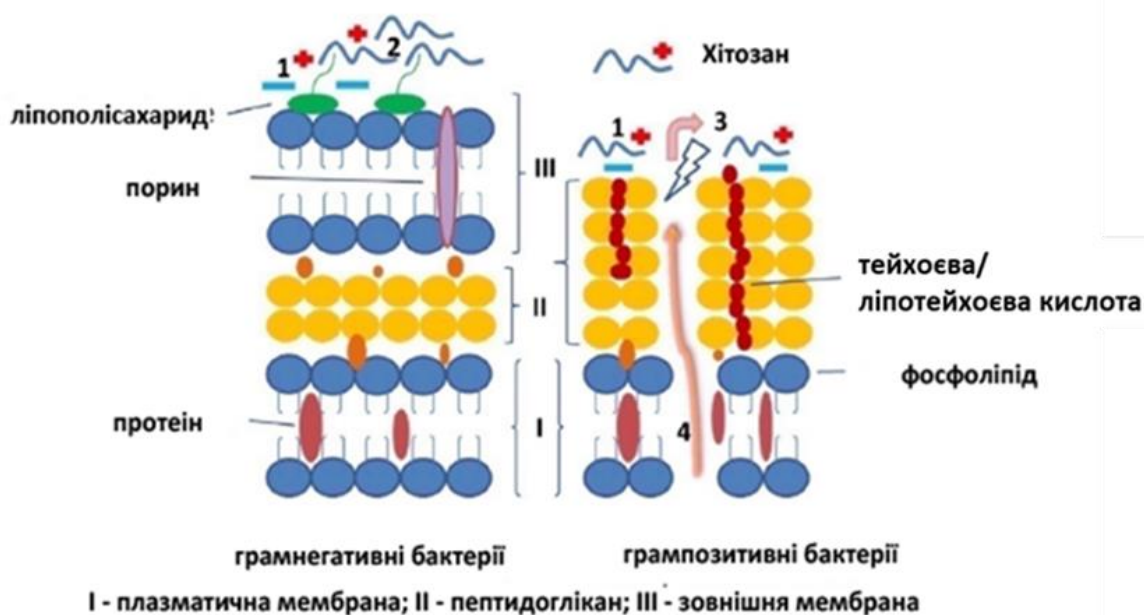


Рисунок 4.1 – Схематичне зображення дії хітозану на клітинну стінку грамнегативних та грампозитивних бактерій: 1 – електростатична адсорбція та взаємодія хітозану з катіонними іонами та клітинною стінкою бактерій; 2 – руйнування зовнішньої мембрани клітинної стінки та блокування потоку поживних речовин; 3 – модифікація клітинної проникності та порушення плазматичної мембрани; 4 – осмотичне пошкодження та вивільнення внутрішньоклітинних речовин

Електроспінінг – це техніка, яку використовують для виготовлення біоматеріалів із контрольованими структурними, механічними та біологічними властивостями [184]. Також цей метод дозволяє поєднувати два полімери з різними властивостями та структурами для покращання характеристик отриманих розчинів. Таким чином, додавання PEG сприяло утворенню нановолокон із меншим діаметром та меншою часткою пористої області. SEM виявила наявність волокон різного розміру, водночас склад розчину моделює їх діаметр і частку пористої області. Поєднання біосумісних полімерів, таких як PLA та хітозан, для виготовлення ефективних біосумісних матеріалів дозволяє їх застосування в біомедичній галузі. З метою подолання гідрофобних властивостей та низької біосумісності PLA додавали PEG як співрозчинник



[185]. Відомо, що додавання PEG до розчину PLA дозволяє підвищити гідрофільність нановолокнистих мембран із PLA. Додавання PEG за допомогою фізичного змішування або хімічної взаємодії змінює змочуваність поверхні PLA мембран, виготовлених методом електропрядіння. Така стратегія покращує стабільність гідрофільних мембран PLA за умов тривалого впливу водних середовищ. Отже, ми визначили, що Ch/PLA-зразки показали покращені рівні гідрофільності за умов додавання PEG [186].

Хітозан, біодеградуєчий природний полісахарид, який отримують із морських джерел, – це достатньо великий та відновлюваний ресурс з антибактеріальною активністю [187]. Механізм антибактеріальної дії хітозану пояснюється наявністю додатково заряджених груп  $\text{NH}_2$ , що заважають біосинтетичним процесам бактеріальних клітин і транспорту через клітинну стінку, спричиняючи загибель бактерій. В інших дослідженнях [188] PEG був ефективним співполімером для нановолокнистих електропрядних мембран, підтримуючи антибактеріальну дію активних інгредієнтів. Гідрофільна природа PEG сприяла ефективному вивільненню антибактеріальних компонентів із волокон та розчиненню їх у PBS.

Нановолокнисті мембрани Ch/PLA виявили слабкі бактеріостатичні властивості, тоді як додавання PEG до розчину як співполімеру значно підвищувало загальну антибактеріальну дію мембран Ch/PLA. Додавання PEG як співполімеру мало різний вплив на антимікробні властивості зразків щодо *S. aureus* та *E. coli*, а саме: відмінність щодо грамнегативних та грампозитивних бактерій може бути пояснена механізмом антибактеріальної дії Ch залежно від особливостей структури цих бактерій [189].

Також відомо, що додавання полімеру PEG до розчину для електроспінінгу має значення для контролю та модифікації клітинної відповіді [190]. Нановолокнисті мембрани Ch/PLA з умістом PEG сприяли прикріпленню та проліферації MSC, а також проникненню MSC через пори. Визначене невелике збільшення метаболічної активності клітин зі зростанням концентрації PEG, що може бути пов'язано зі збільшенням гідрофільності досліджуваних

матеріалів. Надалі мембрани Ch/PLA підлягали обробленню 1 М NaOH для зниженню їх розчинності й збереженню нановолокнистої структури. Встановлено, що додавання PEG зберігає біосумісність нановолокон Ch/PLA завдяки сприятливій топографічній поверхні для прикріплення клітин після проведеної нейтралізації лугом.

Одержані результати дослідження спонукали до подальших досліджень із використання електропрядених нановолокнистих матеріалів як антимікробних засобів для контролю адгезії та проліферації бактерій завдяки структурним та фізико-хімічним властивостям мембран, а також виробництва модифікованих наночастинками нановолокнистих нерозчинних мембран із хітозану, придатних для біомедичних застосувань і тканинної інженерії [191], [192], [193].

Срібні наночастинки (AgNPs) відомі своїми потужними антибактеріальними властивостями, а комбінація хітозану та полімолочної кислоти (PLA) здатна забезпечити біосумісність матеріалу. Електропрядені нановолокна Ch/PLA, навантажені AgNPs, продемонстрували однорідну морфологію з рівномірним розподілом наночастинок срібла по всій поверхні волокон [194]. Модифікація AgNPs мембран Ch/PLA не лише покращувала механічні властивості волокон, а й сприяла утворенню більш стабільної нановолокнистої структури. Спостерігалось значне зниження діаметра волокон, що покращує загальну поверхневу площу, доступну для взаємодії з бактеріями та іншими клітинами. Наявність AgNPs у складі нановолокон істотно знижувала адгезію бактеріальних клітин до поверхні матеріалу. Це пояснюється антибактеріальною активністю срібних наночастинок, які запобігають колонізації та біоплівкоутворенню [195]. Нановолокна Ch/PLA-мембрани, навантажені AgNPs, демонстрували високу антибактеріальну ефективність проти широкого спектра патогенів, включаючи грампозитивні (*S. aureus*) та грамнегативні (*E. coli*) бактерії. Дослідження показують, що вміст срібла у волокнах забезпечує постійне виділення іонів Ag<sup>+</sup>, що інгібує ріст бактерій та руйнує їх клітинні стінки. Таким чином, матеріал ефективно знижує бактеріальне навантаження на поверхні, запобігаючи формуванню біоплівки

[196].

Інтеграція срібних наночасток у ці мембрани підвищувала та збалансовувала їх дозозалежну антимікробну ефективність, починаючи з 25–50 мкл/мл, проти *S. aureus* і *E. coli* [197]. Антибіоплівкова активність мембран проти цих бактеріальних штамів ще раз підкреслює їх ефективність у боротьбі з мікробними інфекціями завдяки посиленій антимікробній дії хітозану додаванням AgNPs [198]. Аналізування сканувальної електронної мікроскопії (SEM) підтвердило морфологічні характеристики електропрядених мембран, що демонструють їх придатність для застосування в тканинній інженерії та регенеративній медицині [199].

Комбінація хітозану й полімолочної кислоти забезпечує пористу структуру мембран та гідрофільні властивості, що сприяють адгезії та проліферації клітин, необхідні для регенерації тканин. Важливим аспектом дослідження було визначення біосумісності та цитотоксичності нановолокон. Результати свідчать, що нановолокна, навантажені AgNPs, виявляють помірну цитотоксичність щодо еукаріотичних клітин. Проте при оптимізації концентрації AgNPs можна досягти балансу між антибактеріальною активністю та безпекою для клітин [200].

Електропрядені нановолокна з хітозану та полімолочної кислоти, навантажені наночастинками срібла, продемонстрували обнадійливі результати для біомедичних застосувань [201]. Вони мають стабільну структурну, ефективні антиадгезивні та антибактеріальні властивості. Оцінювання біосумісності з використанням мезенхімальних стовбурових клітин пуповини показало дозозалежний токсичний характер мембран, який може бути пом'якшений фізіологічним середовищем рани, що свідчить про їх безпеку для потенційного біомедичного застосування [202]. Ці висновки доводять потенціал електропрядених мембран хітозану як універсальних матеріалів для різноманітних біомедичних застосувань, включаючи лікування ран, тканинну інженерію та доставку ліків [203], [204].

Гнійні рани потребують бактеріального очищення для належного

фізіологічного загоєння. Оскільки після гемостазу починається перша запальна фаза, спрямована на усунення патогенів і сторонніх матеріалів [205], антибактеріальні засоби необхідні на цьому етапі для швидкого знищення бактерій без порушення відновлювальних механізмів. Додавання наночастинок срібла (AgNPs) може підвищити ефективність мембран завдяки синергії різних антибактеріальних механізмів. AgNPs мають високу антибактеріальну активність проти різних штамів бактерій, що дозволяє подолати токсичність срібла й застосовувати їх у клінічній практиці. Дослідження *in vivo* показують високу ефективність як хітозан / полілактидних (Ch / PLA) мембран з AgNPs, так і PLA з хлоргексидином. Обидві стратегії швидше усувають бактерії порівняно зі звичайними Ch / PLA-мембранами. PLA з хлоргексидином зв'язується з негативно зарядженими ділянками клітини, дестабілізує клітинну стінку й спричиняє загибель клітин. Антимікробна дія AgNPs включає утворення активних форм кисню (ROS), пряме пошкодження мембрани та блокування білків / ДНК. Комбінація Ch / PLA з AgNPs забезпечує тривалий ефект і може запобігти повторній інфекції. Швидке усунення мікроорганізмів знижує запальну інфільтрацію та сприяє загоєнню ран. Швидке знищення бактерій стимулює фізіологічне запалення і сприяє нормальному процесу відновлення, створюючи належне середовище для регенерації тканин. Макрофаги відіграють ключову роль у цьому процесі [206]. Макрофаги демонструють пластичність, виконуючи як руйнівні, так і відновлювальні функції. Прозапальні макрофаги M1 (CD68+), активовані мікробними ліпополісахаридами (LPS), виробляють цитокіни (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$ ), забезпечуючи захист від патогенів через фагоцитоз і створення активних форм кисню та азоту [207]. Вони також залучають інші імунні клітини, зокрема нейтрофіли. Макрофаги M2, активовані цитокінами Th2 (IL-4, IL-13), виробляють протизапальні цитокіни (IL-10, TGF- $\beta$ ) і сприяють відновленню тканин через фактори росту (VEGF, TGF- $\beta$ ), стимулюючи ангіогенез, проліферацію міофібробластів і формування грануляційної тканини. Баланс між макрофагами M1 і M2 визначає процес загоєння ран.

Наше дослідження показало, що мембрани Ch/PLA з наночастинками срібла сприяють переходу макрофагів від фенотипу M1 до M2. Це забезпечує прямий і непрямий позитивний вплив на загоєння ран, скорочуючи запальну фазу й підтримуючи проліферативну фазу та ремоделювання тканин [208].

На 3-тю добу експерименту вивчення гістологічної тканини свідчить, що в рані є запалення з найбільшою активністю клітинам CD68 у мембран Ch/PLA-AgNPs, та найменшою в мембран PLA-хлоргексидин. Найбільший рівень CD163 клітин у зразках Ch/PLA-AgNPs та Ch/PLA свідчить про наявність запального процесу, який сприяє знищенню мікроорганізмів та очищенню тканин від некротизованих клітин і детриту, в той час як активність у зразках PLA-хлоргексидин найменше клітин, що свідчить про те, що імунна модуляція настає повільніше, ніж у вищеперелічених зразках. Найбільший показник рівня клітин MPO був установлений у гістологічних зразках щурів, які отримували лікування мембранами Ch/PLA, що свідчить про протизапальну відповідь, а в мембранах Ch/PLA-AgNPs та PLA-хлоргексидин цей показник менший більше ніж удвічі, що свідчить про активацію макрофагів, які зазвичай сприяють протизапальним процесам та ремоделюванню тканин. На 10-ту добу спостерігалось зменшення CD68 у зразках щурів із лікуванням Ch/PLA-AgNPs та Ch/PLA, що свідчить про зменшення запального процесу в рані, а в зразку PLA-хлоргексидин, навпаки, збільшення клітин CD68, що свідчить про наявність запалення та активність макрофагів у тканинах, наявність інфекції у рані [209]. Зменшення кількості клітин CD163 свідчить про зниження активності фагоцитозу, зменшення запального процесу, тоді як у зразках Ch/PLA відбулося збільшення клітин CD163, що свідчить про наявність запального процесу та активації фагоцитозу, як і в зразках PLA-хлоргексидин [210]. Показники MPO майже не змінилися порівняно з третім днем, що свідчить про продовження протизапальної відповіді, мінімізацію тканинного пошкодження [211]. На 21-шу добу дослідження гістологічного матеріалу за умов застосування Ch/PLA-AgNPs-мембран виявило незначне підвищення кількості клітин CD68, що свідчить про початкові регенеративні процеси [212]. У зразках Ch/PLA-AgNPs спостерігається незначне

підвищення рівня клітин CD163, що свідчить про тканинну регенерацію [213]. Показник рівня MPO в мембранах Ch/PLA-AgNPs збільшився більше ніж удвічі порівняно з 3-ю та 10-ю добами, що свідчить про протизапальну відповідь та ремоделювання тканин у процесі ранового загоєння, в зразках PLA-хлоргексидин виявили незначне зменшення клітин MPO, що свідчить про погіршення тканинного відновлення [214].

Дослідження продемонструвало, що використання мембран PLA-хлоргексидин, Ch/PLA та Ch/PLA, модифікованих AgNPs, значно впливає на процес загоєння гнійних ран та їх мікробіологічний профіль. Мембрани PLA-хлоргексидин та Ch/PLA, модифіковані AgNPs, продемонстрували швидше загоєння ран та ефективнішу епітелізацію порівняно з Ch/PLA-мембранами. На 15-й день епітелізація була завершена в щурів із мембранами PLA-хлоргексидин та Ch/PLA-AgNPs, тоді як у групі з Ch/PLA-мембранами це відбулося лише на 17-й день. Морфометричний аналіз засвідчив значне прискорення закриття ран у групах із мембраною PLA-хлоргексидин та Ch/PLA-AgNPs, починаючи з 10-го дня.

Мікробіологічне дослідження ранового ексудату показало, що всі досліджувані методи лікування знижували рівень бактеріальної колонізації до 7-го дня після початку лікування. Однак мембрани Ch/PLA-AgNPs виявилися більш ефективними в зниженні рівня бактерій, зокрема *E. coli*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Застосування цих мембран забезпечувало значне зниження кількості бактерій до 5 log КУО/мл та 4 log КУО/мл до 7-го дня експерименту. На 14-ту добу мембрани Ch/PLA-AgNPs продемонстрували вищу активність порівняно з PLA-хлоргексидин-зразками щодо грамнегативних бактерій, що привело до повного звільнення ранової поверхні від *P. aeruginosa*.

Отже, хітозан завдяки своїм біосумісним, біодеградабельним та антимікробним властивостям привертає значну увагу в галузі біомедичних застосувань, зокрема, в тканинній інженерії, ранових пов'язках та системах доставки ліків. Електропрядені нановолокнисті мембрани з хітозану є перспективними матеріалами, проте їх механічні та біологічні властивості

залежать від методу нейтралізації після електроспінінгу. Нейтралізація лужними розчинами NaOH зберігає структурну цілісність нановолокон, забезпечує високу механічну міцність. Додавання PEG покращує структуру мембран, зменшуючи діаметр волокон і збільшуючи гідрофільність. Антибактеріальні тести показали, що мембрани з PEG ефективніше інгібують ріст *E. coli* та *S. aureus*. Дослідження з FTIR продемонстрували зміни в хімічній структурі хітозану через взаємодію з TFA/DCM, що покращує антибактеріальні властивості. Додавання AgNPs до мембран Ch/PLA підвищує їх антибактеріальну активність, особливо проти *E. coli*. Виявлено, що мембрани Ch/PLA-AgNPs сприяють переходу макрофагів від прозапального до протизапального фенотипу, що покращує загоєння ран. Дослідження *in vivo* підтвердили, що мембрани Ch/PLA-AgNPs та PLA-хлоргексидин забезпечують швидше загоєння гнійних ран та ефективніше знижують бактеріальне навантаження, зокрема, *E. coli*, *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Таким чином, електропрядені мембрани з хітозану, особливо з додаванням PEG та AgNPs, є перспективними для біомедичних застосувань завдяки покращеній механічній міцності, антибактеріальним властивостям та біосумісності.

Таким чином, мембрани Ch/PLA, модифіковані AgNPs, продемонстрували найвищу ефективність як у прискоренні загоєння ран, так і в боротьбі з бактеріальною інфекцією, що робить їх перспективними для використання в лікуванні гнійних ран.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведені теоретичні узагальнення та нові результати, що вирішують наукове завдання, суть якої полягає у створенні нових тривимірних волокнистих матеріалів з інкорпорованими наночастинками для медичного застосування, встановлення їх фізико-хімічних властивостей, оцінювання біосумісності та антибактеріальних властивостей *in vitro* та *in vivo*.

1. Під час дослідження були створені хітозанові нановолокнисті мембрани методом електропрядіння з контрольованими структурними та фізико-хімічними властивостями за умов застосування визначених оптимальних параметрів електропрядіння, параметрів розчину та співвідношення розчинників, а також оптимальних параметрів нейтралізації розчином лугу. Використання системи електропрядіння для виготовлення волокнистих матеріалів із контрольованими параметрами (швидкість обертання циліндричного колектора – 1 000 об/хв, рівень напруги – 33 кВ, швидкість подачі розчину – 5,0 мл/год, колектор розміщували на відстані 15 см від кінця голки) дозволило отримати мембрану з розчину хітозану в системі співрозчинників TFA/DCM у співвідношеннях 7:3 та 9:1, які склалися з хаотично орієнтованих тонких волокон із середнім діаметром  $0,18 \pm 0,009$  мкм і  $0,2 \pm 0,01$  мкм та мали «частку пористої області»  $38,94 \% \pm 5,6 \%$  та  $5,4 \% \pm 1,9 \%$  відповідно.

2. З метою запобігання розчиненню нановолоконних мембран хітозану у водяному середовищі нейтралізація в 70 % спиртовому 1 М розчині NaOH дозволила зберегти нановолокнисту структуру мембран без істотних змін морфології та впливу на показники її пористості порівняно з іншими лужними розчинами. SEM підтвердило стабільність нановолокнистої структури після оброблення спиртовим розчином NaOH. Діаметр волокон збільшився до  $0,37 \pm 0,015$  мкм і  $0,3 \pm 0,01$  мкм для мембран, виготовлених із розчинів хітозану та системи співрозчинників TFA/DCM у співвідношеннях 7:3 та 9:1 відповідно. Після нейтралізації в NaOH-етанолі нановолокна електропряденої мембрани хітозану набули помірної здатності до набряку в короткотривалому дослідженні та зберігали свою структуру навіть після довготривалого занурення в PBS



упродовж 1 місяця. Дослідження на культурі клітин підтвердило біосумісність зразків протягом 6 діб культивування. Бактеріологічне дослідження довело помірну антибактеріальну та антиадгезивну ефективність виготовлених зразків упродовж 8 годин співкультивування, а також виявило більшу чутливість до антимікробного впливу хітозану в *E. coli* порівняно з *S. aureus*.

3. З урахуванням одержаних результатів та з метою забезпечення покращених структурних і функціональних властивостей нановолокнистих мембран були створені зразки за допомогою комбінації полімерних розчинів природного (хітозан) та синтетичного (полімолочна кислота) полімерів та поліетиленгліколю (PEG) як співрозчинника. Додавання PLA сприяло утворенню волокон із пористою структурою та покращило електропрядіння розчину, наявність PEG привела до зменшення середнього діаметра волокон менше ніж 100 нм та збільшення кількості пор із розмірами менше ніж 50 нм<sup>2</sup>, що загалом, удосконалюючи процес електропрядіння, сприяло підвищенню якості нановолокон. Додавання PEG до розчину Ch/PLA не збільшило втрати маси електропрядених нановолокнистих мембран під час експерименту з деградації, демонструючи навіть нижчу на 25 % швидкість деградації впродовж одного тижня випробувань порівняно зі зразком без додавання PEG. Наявність PEG як співрозчинника покращувала гідрофільність мембрани, зменшуючи контактний кут із  $51,97 \pm 12,11^\circ$  до  $22,65 \pm 7,40^\circ$ .

4. Результати аналізу загальної метаболічної активності щодо відновлення резазурину підтвердили нетоксичність мембран для клітин незалежно від умісту PEG, проте після нейтралізації спиртовим розчином NaOH зразки продемонстрували більший рівень відновлення резазурину, ніж не оброблені лугом. Результати бактеріологічних досліджень показують, що зразки Ch/PLA-PEG демонструють підвищену антибактеріальну активність проти обох видів бактерій через 4 та 6 годин інкубації. Потрібно зазначити, що *E. coli* демонструвала вищу чутливість до антибактеріального ефекту мембран Ch/PLA-PEG так само, як і до властивостей контактної інгібіції мембран, визначеної дискодифузійним методом. За допомогою SEM виявлено, що як мембрани

Ch/PLA, так і мембрани Ch/PLA-PEG ефективно протидіяли утворенню біоплівки *E. coli*.

5. Нановолокнисті електропрядені Ch/PLA-PEG мембрани були модифіковані наночастинками срібла з подальшим їх дослідженням *in vitro* щодо біосумісності та антибактеріальних властивостей залежно від кількості навантажених AgNPs. Модифікована електропрядена мембрана зберігала високу пористість до 16 %, волокна мали гладку, однорідну морфологію без потовщень із діаметрами від 0,07 до 0,7 мкм. Оброблення нановолокон NaOH привело до зменшення до 0° контактного кута, підтверджуючи супергідрофільні властивості зразків. Навантаження срібними наночастинками нановолокнистих мембран у концентрації 12,5 мкг/мл не виявило цитотоксичних ефектів, сприяло проліферації та адгезії клітин, демонструючи високу біосумісність модифікованих зразків. Результати бактеріологічного дослідження встановили, що навантаження мембран 50 мкг/мл та 25 мкг/мл наночастинок срібла забезпечують більш виражений антибактеріальний ефект на *E. coli*, ніж на *S. aureus*, упродовж 6 годин експерименту. Варто зазначити, що концентрації доданих наночастинок 50, 25 та 12,5 мкг/мл не показали значної відмінності в антибіоплівковій активності модифікованих зразків залежно від грамналежності бактерій. Обидва типи бактерій зазнали впливу, що проявилось змінами в морфології, а саме ознаки лізису з порушеною клітинною стінкою, що було візуалізовано з використанням SEM.

6. В експерименті на лабораторних щурах мембрани Ch/PLA, модифіковані наночастинками срібла (100 мкг/мл), продемонстрували більш виражену антибактеріальну активність порівняно з мембранами, які не містили наночастинок срібла, з 5-ї доби спостереження. Було показано, що використання AgNPs-вмісних матеріалів ефективно знижувало мікробне навантаження всіма застосованими для моделювання гнійної рани бактеріальними штамами та ефективно впливало на параметри загоєння ран. Модифіковані наночастинками мембрани, застосовані для лікування модельованих гнійних ран у щурів, сприяли прискоренню очищення й закриття ран таким чином, що синергічний ефект Ch

та AgNPs оптимізував лікування інфікованих ран, сприяючи загоєнню завдяки властивостям хітозану та потенціюючи антимікробну дію завдяки наночастинкам срібла. Гістологічні та імуногістохімічні дослідження підтвердили відмінності щодо рівнів маркерів запалення та фіброзу на різних етапах експерименту, що свідчить про різний ступінь ефективності використаних матеріалів. Мембрани Ch/PLA-AgNPs показали найкращі результати на 21-шу добу щодо зниження рівня запальних маркерів, що свідчить про їх ефективність у прискоренні загоєння та зменшенні запалення.

7. Комплексний аналіз результатів структурних, фізико-хімічних та біологічних досліджень Ch/PLA-PEG мембран, виготовлених методом електропрядіння з використанням попередньо визначених параметрів, оптимальних для отримання нановолокнистих мембран та подальшої модифікації AgNPs, доводить, що отримані нановолокнисті мембрани, інкорпоровані наночастинками металів, можуть бути основою для розроблення інноваційних біосумісних матеріалів із посиленими антимікробними властивостями для лікування гнійних ран шкіри.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

- [1] C. Garreau *et al.*, “Preparation of highly stable and ultrasmooth chemically grafted thin films of chitosan,” *Soft Matter*, vol. 19, no. 8, 2023, doi: 10.1039/d3sm00003f.
- [2] Y. Kankariya and B. Chatterjee, “Biomedical Application of Chitosan and Chitosan Derivatives: A Comprehensive Review,” *Curr Pharm Des*, vol. 29, no. 17, 2023, doi: 10.2174/1381612829666230524153002.
- [3] M. Kamaraj *et al.*, “New dimensions of electrospun nanofiber material designs for biotechnological uses,” *Trends in Biotechnology*, vol. 42, no. 5. 2024. doi: 10.1016/j.tibtech.2023.11.008.
- [4] G. Ren *et al.*, “Recent advance in biomass membranes: Fabrication, functional regulation, and antimicrobial applications,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 305. 2023. doi: 10.1016/j.carbpol.2023.120537.
- [5] E. S. Ribeiro, B. S. de Farias, T. R. Sant’Anna Cadaval Junior, L. A. de Almeida Pinto, and P. S. Diaz, “Chitosan–based nanofibers for enzyme immobilization,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 183. 2021. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.214.
- [6] L. Bo *et al.*, “Combating antimicrobial resistance: the silent war,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 15. 2024. doi: 10.3389/fphar.2024.1347750.
- [7] A. Ravichandran, D. Shobana, S. Visudha, Yazhini, S. Niveditha, and P. Saravanan, “Bacterial Exopolysaccharides-Based Nanomaterials for Targeting Biofilm-Associated Infections,” 2024. doi: 10.4018/979-8-3693-0448-8.ch015.
- [8] S. Kailasa, M. S. B. Reddy, M. R. Maurya, B. G. Rani, K. V. Rao, and K. K. Sadasivuni, “Electrospun Nanofibers: Materials, Synthesis Parameters, and Their Role in Sensing Applications,” *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 306, no. 11. 2021. doi: 10.1002/mame.202100410.
- [9] J. Yang and L. Xu, “Electrospun Nanofiber Membranes with Various Structures for Wound Dressing,” *Materials*, vol. 16, no. 17, 2023, doi: 10.3390/ma16176021.
- [10] I. Shepa, E. Mudra, and J. Dusza, “Electrospinning through the prism of time,”

- Materials Today Chemistry*, vol. 21, 2021. doi: 10.1016/j.mtchem.2021.100543.
- [11] N. Bölgen, D. Demir, M. Aşık, B. Sakım, and A. Vaseashta, "Introduction and Fundamentals of Electrospinning," in *Electrospun Nanofibers: Principles, Technology and Novel Applications*, 2022. doi: 10.1007/978-3-030-99958-2\_1.
- [12] S. N. Jayasinghe, "Unspooling the history of cell electrospinning," *Matter*, vol. 5, no. 1, 2022, doi: 10.1016/j.matt.2021.11.025.
- [13] A. Das *et al.*, "Electrospinning: The State of Art Technique for the Production of Nanofibers and Nanofibrous Membranes for Advanced Engineering Applications," in *Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials*, 2021. doi: 10.1007/978-981-15-8844-0\_2.
- [14] S. Vijayakumar, K. Vijayalakshmi, V. Sangeetha, and E. Radha, "Electrospinning-Material, Techniques and Biomedical Applications," in *Nanobiomaterials: Research Trends and Applications*, 2023. doi: 10.1201/9780429057038-5.
- [15] T. Rakhi, M. Pragati, B. Prerna, and S. Jyoti, "Multifaceted approach for nanofiber fabrication," in *Fiber and Textile Engineering in Drug Delivery Systems*, 2022. doi: 10.1016/B978-0-323-96117-2.00012-1.
- [16] T. Czapka, A. Winkler, I. Maliszewska, and R. Kacprzyk, "Fabrication of photoactive electrospun cellulose acetate nanofibers for antibacterial applications," *Energies (Basel)*, vol. 14, no. 9, 2021, doi: 10.3390/en14092598.
- [17] Y. Guo *et al.*, "Triboelectric Nanogenerator-Based Near-Field Electrospinning System for Optimizing PVDF Fibers with High Piezoelectric Performance," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 15, no. 4, 2023, doi: 10.1021/acsami.2c19568.
- [18] S. Thomas *et al.*, "Eco-friendly, biodegradable, and biocompatible electrospun nanofiber membranes and applications," in *Sustainable Nanotechnology: Strategies, Products, and Applications*, 2022. doi: 10.1002/9781119650294.ch11.
- [19] A. Liguori *et al.*, "Thermoactive Smart Electrospun Nanofibers," *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 43, no. 5, 2022. doi: 10.1002/marc.202100694.

- [20] D. T. Putro and C. S. Chu, “A novel optical dual sensor based on a coaxial electrospinning method for simultaneous sensing of oxygen and ammonia,” *Heliyon*, vol. 10, no. 4, 2024, doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e25983.
- [21] H. B. Isgen, S. Samatya Yilmaz, and A. Aytac, “The Production of Hollow Nanofibers from PBS/TPU Blends by Coaxial Electrospinning Method,” *Gazi University Journal of Science*, vol. 37, no. 1, 2024, doi: 10.35378/gujs.1199571.
- [22] A. L. Gürtler, I. Linseisen, H. Grohgan, and A. Heinz, “Coaxial electrospinning of polycaprolactone – A design of experiments approach,” *Eur Polym J*, vol. 208, 2024, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2024.112886.
- [23] W. He *et al.*, “Integrating coaxial electrospinning and 3D printing technologies for the development of biphasic porous scaffolds enabling spatiotemporal control in tumor ablation and osteochondral regeneration,” *Bioact Mater*, vol. 34, 2024, doi: 10.1016/j.bioactmat.2023.12.020.
- [24] B. Liu, J. Zhang, and H. Guo, “Research Progress of Polyvinyl Alcohol Water-Resistant Film Materials,” *Membranes*, vol. 12, no. 3, 2022. doi: 10.3390/membranes12030347.
- [25] C. L. Huang, H. Y. Huang, Y. C. Lu, C. J. Cheng, and T. M. Lee, “Development of a flexible film made of polyvinyl alcohol with chitosan based thermosensitive hydrogel,” *J Dent Sci*, vol. 18, no. 2, 2023, doi: 10.1016/j.jds.2023.01.007.
- [26] K. G. Nathan, K. Genasan, and T. Kamarul, “Polyvinyl Alcohol-Chitosan Scaffold for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Application: A Review,” *Marine Drugs*, vol. 21, no. 5, 2023. doi: 10.3390/md21050304.
- [27] X. Zhang *et al.*, “Advances in wound dressing based on electrospinning nanofibers,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 141, no. 1, 2024. doi: 10.1002/app.54746.
- [28] I. P. Beckman, G. Berry, M. Ucak-Astarlioglu, T. L. Thornell, H. Cho, and G. Riveros, “Stabilized Electrospun Polyacrylonitrile Fibers for Advancements in Clean Air Technology,” *Atmosphere (Basel)*, vol. 14, no. 3, 2023, doi: 10.3390/atmos14030573.
- [29] O. Rac-Rumijowska and H. Teterycz, “Electrical Conductance Mechanism of

- Silver–Polyacrylonitrile Nanocomposite Fibers,” *Materials*, vol. 16, no. 8, 2023, doi: 10.3390/ma16083085.
- [30] V. Vatanpour, M. E. Pasaoglu, B. Kose-Mutlu, and I. Koyuncu, “Polyacrylonitrile in the Preparation of Separation Membranes: A Review,” *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 62, no. 17, 2023. doi: 10.1021/acs.iecr.3c00057.
- [31] M. R. Latifi, Ö. Biricik, and A. Mardani Aghabaglou, “Effect of the addition of polypropylene fiber on concrete properties,” *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 36, no. 4, 2022. doi: 10.1080/01694243.2021.1922221.
- [32] J. Ahmad, D. D. Burduhos-Nergis, M. M. Arbili, S. M. Alogla, A. Majdi, and A. F. Deifalla, “A Review on Failure Modes and Cracking Behaviors of Polypropylene Fibers Reinforced Concrete,” *Buildings*, vol. 12, no. 11, 2022. doi: 10.3390/buildings12111951.
- [33] M. Pourmadadi, A. Shamsabadipour, A. Aslani, M. M. Eshaghi, A. Rahdar, and S. Pandey, “Development of Polyvinylpyrrolidone-Based nanomaterials for biosensors applications: A Review,” *Inorganic Chemistry Communications*, vol. 152, 2023. doi: 10.1016/j.inoche.2023.110714.
- [34] S. Lapuk *et al.*, “Some aspects of the glass transition of polyvinylpyrrolidone depending on the molecular mass,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 25, no. 15, 2023, doi: 10.1039/d2cp05972j.
- [35] E. Olăreț *et al.*, “Nanostructured Polyacrylamide Hydrogels with Improved Mechanical Properties and Antimicrobial Behavior,” *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 12, 2022, doi: 10.3390/polym14122320.
- [36] F. Helmprobst, A. Hupfer, M. Lauth, and A. Pagenstecher, “Electron Microscopy of Cells Grown on Polyacrylamide Hydrogels,” *Curr Protoc*, vol. 2, no. 8, 2022, doi: 10.1002/cpz1.524.
- [37] I. Issahaku, I. K. Tetteh, and A. Y. Tetteh, “Chitosan and chitosan derivatives: Recent advancements in production and applications in environmental remediation,” *Environmental Advances*, vol. 11, 2023. doi: 10.1016/j.envadv.2023.100351.

- [38] N. Desai *et al.*, “Chitosan: A Potential Biopolymer in Drug Delivery and Biomedical Applications,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 4. 2023. doi: 10.3390/pharmaceutics15041313.
- [39] K. Thirupathi *et al.*, “Update on Chitosan-Based Hydrogels: Preparation, Characterization, and Its Antimicrobial and Antibiofilm Applications,” *Gels*, vol. 9, no. 1. 2023. doi: 10.3390/gels9010035.
- [40] W. Ali, H. Ali, S. Gillani, P. Zinck, and S. Souissi, “Polylactic acid synthesis, biodegradability, conversion to microplastics and toxicity: a review,” *Environmental Chemistry Letters*, vol. 21, no. 3. 2023. doi: 10.1007/s10311-023-01564-8.
- [41] M. W. Myburgh, L. Favaro, W. H. van Zyl, and M. Viljoen-Bloom, “Engineered yeast for the efficient hydrolysis of polylactic acid,” *Bioresour Technol*, vol. 378, 2023, doi: 10.1016/j.biortech.2023.129008.
- [42] N. More, M. Avhad, S. Utekar, and A. More, “Polylactic acid (PLA) membrane—significance, synthesis, and applications: a review,” *Polymer Bulletin*, vol. 80, no. 2. 2023. doi: 10.1007/s00289-022-04135-z.
- [43] X. Du, L. Chen, J. He, X. Li, and M. Zhao, “Preparation and properties of colorimetric sensing nanofiber membrane with wound monitoring function,” *Fangzhi Xuebao/Journal of Textile Research*, vol. 44, no. 5, 2023, doi: 10.13475/j.fzxb.20211111601.
- [44] L. Muthukrishnan, “An overview on electrospinning and its advancement toward hard and soft tissue engineering applications,” *Colloid and Polymer Science*. 2022. doi: 10.1007/s00396-022-04997-9.
- [45] A. A. Shamsuri, K. Abdan, and S. N. A. M. Jamil, “Preparations and Properties of Ionic Liquid-Assisted Electrospun Biodegradable Polymer Fibers,” *Polymers*, vol. 14, no. 12. 2022. doi: 10.3390/polym14122308.
- [46] N. Nachev, M. Spasova, N. Manolova, I. Rashkov, and M. Naydenov, “Electrospun Polymer Materials with Fungicidal Activity: A Review,” *Molecules*, vol. 27, no. 17. 2022. doi: 10.3390/molecules27175738.
- [47] D. N. Poshina, I. A. Khadyko, A. A. Sukhova, I. V. Serov, N. M. Zabivalova,



- and Y. A. Skorik, "Needleless Electrospinning of a Chitosan Lactate Aqueous Solution: Influence of Solution Composition and Spinning Parameters," *Technologies (Basel)*, vol. 8, no. 1, 2020, doi: 10.3390/technologies8010002.
- [48] L. Muthukrishnan, S. Sagadevan, and M. A. M. Hossain, "Metal oxide-based fiber technology in the pharmaceutical and medical chemistry," in *Metal Oxides for Optoelectronics and Optics-Based Medical Applications*, 2022. doi: 10.1016/B978-0-323-85824-3.00005-1.
- [49] A. Floranda, M. Situmorang, K. Tarigan, D. Bonardo, and I. V. Albadi'Ah, "Design and construction of high voltage electrospinning with flyback based power supply for nanofibers manufacturing applications," in *AIP Conference Proceedings*, 2022. doi: 10.1063/5.0123812.
- [50] K. Rolińska *et al.*, "Electrospun Poly(carbonate-urea-urethane)s Nonwovens with Shape-Memory Properties as a Potential Biomaterial," *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 9, no. 12, 2023, doi: 10.1021/acsbiomaterials.3c01214.
- [51] S. Taokaew and T. Chuenkaek, "Developments of Core/Shell Chitosan-Based Nanofibers by Electrospinning Techniques: A Review," *Fibers*, vol. 12, no. 3, 2024. doi: 10.3390/fib12030026.
- [52] Y. Shen, H. Luo, J. Hou, and F. Xie, "Transparent and iridescent photonic films with intelligent responsive ability based on electrospun core-shell nanofibrous membranes," *Soft Matter*, vol. 19, no. 25, 2023, doi: 10.1039/d3sm00631j.
- [53] C. Boonpratum, P. Naemchanthara, P. Limsuwan, and K. Naemchanthara, "Effects of chitosan and Tween 80 addition on the properties of nanofiber mat through the electrospinning," *E-Polymers*, vol. 22, no. 1, 2022, doi: 10.1515/epoly-2022-0029.
- [54] D. Sharma *et al.*, "Biodegradable Electrospun Scaffolds as an Emerging Tool for Skin Wound Regeneration: A Comprehensive Review," *Pharmaceuticals*, vol. 16, no. 2, 2023. doi: 10.3390/ph16020325.
- [55] Č. Dragar, Ž. Rekar, T. Potrč, S. Nemec, S. Kralj, and P. Kocbek, "Influence of Polymer Concentration on Drying of SPION Dispersions by Electrospinning," *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 6, 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15061619.

- [56] M. Ma, H. Zhou, S. Gao, N. Li, W. Guo, and Z. Dai, "Analysis and Prediction of Electrospun Nanofiber Diameter Based on Artificial Neural Network," *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 13, 2023, doi: 10.3390/polym15132813.
- [57] M. Davoudabadi Farahani, M. Jamshidi Avanaki, and A. A. A. Jeddi, "Sound absorption of warp knitted spacer fabrics based on knit structure and nanofiber enhancement," *Journal of Industrial Textiles*, vol. 51, no. 10, 2022, doi: 10.1177/1528083720903411.
- [58] C. Voniatis, O. Závoti, K. Manikion, B. Budavári, and A. J. Hajdu, "Fabrication of Mechanically Enhanced, Suturable, Fibrous Hydrogel Membranes," *Membranes (Basel)*, vol. 13, no. 1, 2023, doi: 10.3390/membranes13010116.
- [59] S. H. Lin, S. L. Ou, H. M. Hsu, and J. Y. Wu, "Preparation and Characteristics of Polyethylene Oxide/Curdlan Nanofiber Films by Electrospinning for Biomedical Applications," *Materials*, vol. 16, no. 10, 2023, doi: 10.3390/ma16103863.
- [60] M. F. Ijaz, H. F. Alharbi, A. Z. Alsaggaf, and A. K. Assaifan, "Aspects of Polymeric-Based Membranes in the Water Treatment Field: An Interim Structural Analysis," *Water (Switzerland)*, vol. 15, no. 6, 2023, doi: 10.3390/w15061114.
- [61] A. Negi and K. K. Kesari, "Chitosan Nanoparticle Encapsulation of Antibacterial Essential Oils," *Micromachines*, vol. 13, no. 8, 2022. doi: 10.3390/mi13081265.
- [62] K. Santiago-Castillo *et al.*, "In Situ Growth of Silver Nanoparticles on Chitosan Matrix for the Synthesis of Hybrid Electrospun Fibers: Analysis of Microstructural and Mechanical Properties," *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 4, 2022, doi: 10.3390/polym14040674.
- [63] M. A. Fakhri *et al.*, "The influence of working distance, stirring and electrospinning time on fibre forming properties of electrospun polylactic acid for facemask layer application," *Mater Today Proc*, vol. 66, 2022, doi: 10.1016/j.matpr.2022.06.507.
- [64] G. ŞİMŞEK GÜNDÜZ, F. GÖKTEPE, H. ALİSOY, and Ö. GÖKTEPE, "AN INVESTIGATION OF THE EFFECT OF COLLECTOR PLATE MATERIAL

- AND THICKNESS ON ELECTROSPUN FIBER FINENESS INCLUDING A THEORETICAL ANALYSIS,” *International Journal of Engineering and Innovative Research*, vol. 5, no. 3, 2023, doi: 10.47933/ijeir.1336360.
- [65] Z. Zhu, M. Yu, R. Ren, H. Wang, and B. Kong, “Thymol incorporation within chitosan/polyethylene oxide nanofibers by concurrent coaxial electrospinning and in-situ crosslinking from core-out for active antibacterial packaging,” *Carbohydr Polym*, vol. 323, 2024, doi: 10.1016/j.carbpol.2023.121381.
- [66] Y. Herdiana, N. Wathoni, S. Shamsuddin, and M. Muchtaridi, “Drug release study of the chitosan-based nanoparticles,” *Heliyon*, vol. 8, no. 1. 2022. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08674.
- [67] W. Wei, M. Wang, Z. Liu, W. Zheng, P. L. Tremblay, and T. Zhang, “An antibacterial nanoclay- and chitosan-based quad composite with controlled drug release for infected skin wound healing,” *Carbohydr Polym*, vol. 324, 2024, doi: 10.1016/j.carbpol.2023.121507.
- [68] S. Goli, D. P. Mudrakola, N. Turagam, M. Thomas, A. Asthana, and I. Bhatnagar, “Tissue engineering and chitosan: a wonder biomaterial,” in *Natural Biopolymers in Drug Delivery and Tissue Engineering*, 2023. doi: 10.1016/B978-0-323-98827-8.00004-7.
- [69] W. F. de Oliveira *et al.*, “Pharmaceutical applications of chitosan on medical implants: A viable alternative for construction of new biomaterials?,” *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, vol. 7, 2024, doi: 10.1016/j.carpta.2023.100407.
- [70] A. Azam *et al.*, “Application of Chitosan-Based Polysaccharide Biomaterials in Tissue Engineering,” *Pakistan Journal of Health Sciences*, 2023, doi: 10.54393/pjhs.v4i09.1038.
- [71] L. Wang, Z. Xu, H. Zhang, and C. Yao, “A review on chitosan-based biomaterial as carrier in tissue engineering and medical applications,” *European Polymer Journal*, vol. 191. 2023. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2023.112059.
- [72] S. Lekhavadhani, A. Shanmugavadivu, and N. Selvamurugan, “Role and architectural significance of porous chitosan-based scaffolds in bone tissue

- engineering,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 251. 2023. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126238.
- [73] R. Zhang, S. J. Chang, Y. Jing, L. Y. Wang, C. J. Chen, and J. T. Liu, “Application of chitosan with different molecular weights in cartilage tissue engineering,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 314. 2023. doi: 10.1016/j.carbpol.2023.120890.
- [74] W. Xiang *et al.*, “Applications of chitosan-based biomaterials: From preparation to spinal cord injury neuroprosthetic treatment,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 230. 2023. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123447.
- [75] R. Shen, Y. Guo, S. Wang, A. Tuerxun, J. He, and Y. Bian, “Biodegradable Electrospun Nanofiber Membranes as Promising Candidates for the Development of Face Masks,” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 20, no. 2. 2023. doi: 10.3390/ijerph20021306.
- [76] H. Sosiati, A. S. Kusuma, and Krisdiyanto, “Characterization of the Properties of Chitosan Nanoparticles (CSNPs)/PEO Nanofibrous Membranes,” in *Materials Science Forum*, 2022. doi: 10.4028/p-6lxwi5.
- [77] M. Z. A. Zulkifli, D. Nordin, N. Shaari, and S. K. Kamarudin, “Overview of Electrospinning for Tissue Engineering Applications,” *Polymers*, vol. 15, no. 11. 2023. doi: 10.3390/polym15112418.
- [78] L. É. Uhljar and R. Ambrus, “Electrospinning of Potential Medical Devices (Wound Dressings, Tissue Engineering Scaffolds, Face Masks) and Their Regulatory Approach,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 2. 2023. doi: 10.3390/pharmaceutics15020417.
- [79] N. Pien *et al.*, “Tissue engineering of skeletal muscle, tendons and nerves: A review of manufacturing strategies to meet structural and functional requirements,” *Applied Materials Today*, vol. 31. 2023. doi: 10.1016/j.apmt.2023.101737.
- [80] Y. Tomar, N. Pandit, S. Priya, and G. Singhvi, “Evolving Trends in Nanofibers for Topical Delivery of Therapeutics in Skin Disorders,” *ACS Omega*, vol. 8, no.

21. 2023. doi: 10.1021/acsomega.3c00924.
- [81] M. M. Abdul Hameed, S. A. P. Mohamed Khan, B. M. Thamer, N. Rajkumar, H. El-Hamshary, and M. El-Newehy, "Electrospun nanofibers for drug delivery applications: Methods and mechanism," *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 34, no. 1. 2023. doi: 10.1002/pat.5884.
- [82] S. S. Ganesh, R. Anushikaa, V. S. Swetha Victoria, K. Lavanya, A. Shanmugavadivu, and N. Selvamurugan, "Recent Advancements in Electrospun Chitin and Chitosan Nanofibers for Bone Tissue Engineering Applications," *Journal of Functional Biomaterials*, vol. 14, no. 5. 2023. doi: 10.3390/jfb14050288.
- [83] G. Ramar, S. Ashokumar, B. K. Periyasamy, and R. J. Bensingh, "Preparation and characterization of hybrid nanofibrous polymer scaffolds for tissue engineering applications," *Indian Journal of Chemical Technology*, vol. 29, no. 6, 2022, doi: 10.56042/ijct.v29i6.67353.
- [84] R. Roy, R. Jan, U. Joshi, R. B. A. Taneja, and P. G. Satsangi, "Functionalization of Bio-polymer based nanofibers with clay minerals as nanofillers: promising material for antibacterial applications," *Journal of Polymer Research*, vol. 29, no. 4, 2022, doi: 10.1007/s10965-022-02967-x.
- [85] H. Oh *et al.*, "Reactive oxygen species scavenging nanofibers with chitosan-stabilized Prussian blue nanoparticles for enhanced wound healing efficacy," *Int J Biol Macromol*, vol. 219, 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.033.
- [86] P. A. Markov *et al.*, "A wound dressing based on a track-etched membrane modified by a biopolymer nanoframe: physicochemical and biological characteristics," *Eur Polym J*, vol. 181, 2022, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111709.
- [87] I. C. Penna, T. S. Martins, and J. V. W. Silveira, "Electrospun Fibers Applied on Heavy Metals Removal from Mining Wastewaters: a Systematic Review," *Revista Virtual de Quimica*, vol. 14, no. 3. 2022. doi: 10.21577/1984-6835.20220088.
- [88] R. Surakasi, J. Mohana, S. Louies Praveen, P. Patil, R. Karthick, and M. I. Alam,

- “Achievements of electro spinning chitosan using composite materials,” *Mater Today Proc*, vol. 66, 2022, doi: 10.1016/j.matpr.2022.04.263.
- [89] R. S. Riseh, M. Hassanisaadi, M. Vatankhah, S. A. Babaki, and E. A. Barka, “Chitosan as a potential natural compound to manage plant diseases,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 220. 2022. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.109.
- [90] Q. Chen *et al.*, “Progress in Research of Chitosan Chemical Modification Technologies and Their Applications,” *Marine Drugs*, vol. 20, no. 8. 2022. doi: 10.3390/md20080536.
- [91] A. O. Francis, M. A. A. Zaini, I. M. Muhammad, S. Abdulsalam, and U. A. El-Nafaty, “Physicochemical modification of chitosan adsorbent: a perspective,” *Biomass Conversion and Biorefinery*, vol. 13, no. 7. 2023. doi: 10.1007/s13399-021-01599-3.
- [92] J. Wang and S. Zhuang, “Chitosan-based materials: Preparation, modification and application,” *Journal of Cleaner Production*, vol. 355. 2022. doi: 10.1016/j.jclepro.2022.131825.
- [93] G. Ramachandran *et al.*, “Chitosan/silver nanocomposites enhanced the biofilm eradication in biofilm forming Gram positive *S. aureus*,” *J King Saud Univ Sci*, vol. 35, no. 4, 2023, doi: 10.1016/j.jksus.2023.102597.
- [94] A. P. P. Hartoyo, E. A. Octaviani, F. A. Syamani, I. W. Mulsanti, and A. Solikhin, “Potential of chitosan/carbon nanoparticles and chitosan/lignocellulose nanofiber composite as growth media for peatland paddy seeds,” *Environ Res*, vol. 212, 2022, doi: 10.1016/j.envres.2022.113235.
- [95] E. R. A. Begum, R. Shenbagarathai, U. Lavanya, and K. Bhavan, “SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTED CHITOSAN-BASED SILVER NANOPARTICLES,” *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 12, no. 5, 2023, doi: 10.55251/jmbfs.4215.
- [96] S. Mumtaz, S. Ali, S. Mumtaz, T. A. Mughal, H. M. Tahir, and H. A. Shakir, “Chitosan conjugated silver nanoparticles: the versatile antibacterial agents,”

- Polymer Bulletin*, vol. 80, no. 5. 2023. doi: 10.1007/s00289-022-04321-z.
- [97] P. Mendez-Pfeiffer *et al.*, “Chitosan-Coated Silver Nanoparticles Inhibit Adherence and Biofilm Formation of Uropathogenic *Escherichia coli*,” *ACS Infect Dis*, vol. 10, no. 4, 2024, doi: 10.1021/acsinfecdis.3c00229.
- [98] S. Municoy, P. E. Antezana, M. G. Bellino, and M. F. Desimone, “Development of 3D-Printed Collagen Scaffolds with In-Situ Synthesis of Silver Nanoparticles,” *Antibiotics*, vol. 12, no. 1, 2023, doi: 10.3390/antibiotics12010016.
- [99] S. Alven and B. A. Aderibigbe, “Chitosan-Based Scaffolds Incorporated with Silver Nanoparticles for the Treatment of Infected Wounds,” *Pharmaceutics*, vol. 16, no. 3. 2024. doi: 10.3390/pharmaceutics16030327.
- [100] A. A. H. Abdellatif, A. Abdelfattah, M. A. Younis, S. M. Aldalaan, and H. M. Tawfeek, “Chitosan-capped silver nanoparticles with potent and selective intrinsic activity against the breast cancer cells,” *Nanotechnol Rev*, vol. 12, no. 1, 2023, doi: 10.1515/ntrev-2022-0546.
- [101] Z. Dang, X. Ma, Z. Yang, X. Wen, and P. Zhao, “Electrospun Nanofiber Scaffolds Loaded with Metal-Based Nanoparticles for Wound Healing,” *Polymers*, vol. 16, no. 1. 2024. doi: 10.3390/polym16010024.
- [102] F. A. Omar, M. M. El-Tonsy, A. H. Oraby, and F. M. Reicha, “Copper and Copper Oxides Nanoparticles Synthesized by Electrochemical Technique in Chitosan Solution,” *International Journal of Science and Engineering Applications*, 2023, doi: 10.7753/ijsea0503.1009.
- [103] M. Ghafarzadeh, M. Kharaziha, M. Atapour, and P. Heidari, “Copper-chitosan nanoparticles incorporated PGS/MAO bilayer coatings for potential cardiovascular application,” *Prog Org Coat*, vol. 174, 2023, doi: 10.1016/j.porgcoat.2022.107269.
- [104] H. Meng *et al.*, “Hydrogels Containing Chitosan-Modified Gold Nanoparticles Show Significant Efficacy in Healing Diabetic Wounds Infected with Antibiotic-Resistant Bacteria,” *Int J Nanomedicine*, vol. 19, 2024, doi: 10.2147/IJN.S448282.

- [105] Y. Ma, F. He, A. F. El-kott, A. S. Alshehri, M. A. Zein, and A. M. Eldib, "Synthesis of gold Nanoparticles Encapsulated Chitosan/Gelatin Polymers for the Treatment of Several Types of Leukemia," *J Inorg Organomet Polym Mater*, vol. 34, no. 1, 2024, doi: 10.1007/s10904-023-02751-4.
- [106] R. Xie *et al.*, "Design and synthesis of chitosan/calcium lignosulfonate/Au NPs: Its performance for reduction of nitro compounds and in the treatment of cancer," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 17, no. 4, 2024, doi: 10.1016/j.arabjc.2024.105709.
- [107] M. Zhao, Y. Liu, and C. Yin, "Gold nanorod-chitosan based nanocomposites for photothermal and chemoembolization therapy of breast cancer," *Int J Biol Macromol*, vol. 259, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.129197.
- [108] Y. Zhao and Q. Sun, "Silver Nanoparticles Incorporated Chitosan Hydrogel as a Potential Dressing Material for Diabetic Wound Healing in Nursing Care," *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, vol. 58, no. 1, 2024, doi: 10.5530/ijper.58.1.14.
- [109] M. Borhani *et al.*, "Crosslinked hydrogel loaded with chitosan-supported iron oxide and silver nanoparticles as burn wound dressing," *Pharm Dev Technol*, vol. 28, no. 10, 2023, doi: 10.1080/10837450.2023.2278613.
- [110] S. A. Karthick, K. Manjari, and M. G. Devi, "Biocompatible and bioactive PVA/Sericin/Chitosan nanofibrous wound dressing matrix," *Applied Surface Science Advances*, vol. 13, 2023, doi: 10.1016/j.apsadv.2022.100362.
- [111] M. S. Pino-Hurtado, R. Fernández-Fernández, C. Torres, and B. Robredo, "Searching for Antimicrobial-Producing Bacteria from Soils through an Educational Project and Their Evaluation as Potential Biocontrol Agents," *Antibiotics*, vol. 13, no. 1, 2024, doi: 10.3390/antibiotics13010029.
- [112] A. Smola-Dmochowska, K. Lewicka, A. Macyk, P. Rychter, E. Pamuła, and P. Dobrzyński, "Biodegradable Polymers and Polymer Composites with Antibacterial Properties," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 8, 2023. doi: 10.3390/ijms24087473.
- [113] J. Li *et al.*, "Chitosan Natural Polymer Material for Improving Antibacterial



- Properties of Textiles,” *ACS Applied Bio Materials*, vol. 4, no. 5. 2021. doi: 10.1021/acsabm.1c00078.
- [114] S. Zhou *et al.*, “Synthesis of bacterial cellulose nanofibers/Ag nanoparticles: Structure, characterization and antibacterial activity,” *Int J Biol Macromol*, vol. 259, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129392.
- [115] J. Ren, T. Liu, X. An, F. Wu, and C. Xie, “Preparation and property of antibacterial filter membrane by coaxial electro-spraying/electrospinning technology,” *J Appl Polym Sci*, vol. 141, no. 4, 2024, doi: 10.1002/app.54847.
- [116] E. O. Medusheva, Yu. S. Fidorovskaya, M. A. Shchedrina, and N. D. Oltarzhevskaya, “A modern polymer based wound care coating for wound management,” *Wounds and wound infections. The prof. B.M. Kostyuchenok journal*, vol. 10, no. 2, 2024, doi: 10.25199/2408-9613-2023-10-2-24-31.
- [117] D. Solano, L. Corredor, and J. C. Chacón-Torres, “SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN FIBERS VIA ELECTROSPINNING,” *Acta Microscopica*, vol. 32, no. 2, 2023.
- [118] A. E. Stoica *et al.*, “Electrospun Nanofibrous Mesh Based on PVA, Chitosan, and Usnic Acid for Applications in Wound Healing,” *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 13, 2023, doi: 10.3390/ijms241311037.
- [119] D. Pamu *et al.*, “Electrospun statin-loaded nanofibers for treating diabetic wounds,” *Polym Eng Sci*, vol. 64, no. 4, 2024, doi: 10.1002/pen.26639.
- [120] N. O.B., S. A.V., S. A.A., and F. R.R., “MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN THE ORGANS OF THE IMMUNE SYSTEM OF RATS DURING VARIOUS METHODS OF LOCAL TREATMENT OF PURULENT WOUNDS IN THE BACKGROUND OF ALLOXAN DIABETES,” *Medical & pharmaceutical journal “Pulse,”* 2024, doi: 10.26787/nydha-2686-6838-2024-26-1-103-108.
- [121] V. A. Mitish *et al.*, “The comprehensive treatment of a phlegmon on the foot dorsum in a patient with idiopathic distal polyneuropathy,” *Wounds and wound infections. The prof. B.M. Kostyuchenok journal*, vol. 10, no. 2, 2024, doi: 10.25199/2408-9613-2023-10-2-32-40.

- [122] V. A. Zolotukhina and E. L. Bezruk, “Characteristics of endotoxemia in different ways of treatment of experimental burn in rats,” *International Journal of Veterinary Medicine*, no. 4, 2023, doi: 10.52419/issn2072-2419.2022.4.440.
- [123] M. Kumar, A. R. Hilles, Y. Ge, A. Bhatia, and S. Mahmood, “A review on polysaccharides mediated electrospun nanofibers for diabetic wound healing: Their current status with regulatory perspective,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 234, 2023. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123696.
- [124] L. Miranda-Calderon *et al.*, “Combinatorial wound dressings loaded with synergistic antibiotics in the treatment of chronic infected wounds,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 476, 2023, doi: 10.1016/j.cej.2023.146679.
- [125] Z. J. Krysiak and U. Stachewicz, “Electrospun fibers as carriers for topical drug delivery and release in skin bandages and patches for atopic dermatitis treatment,” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 15, no. 1. 2023. doi: 10.1002/wnan.1829.
- [126] S. Qu, X. Ma, S. Yu, and R. Wang, “Chitosan as a biomaterial for the prevention and treatment of dental caries: antibacterial effect, biomimetic mineralization, and drug delivery,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 11. 2023. doi: 10.3389/fbioe.2023.1234758.
- [127] D. Gheorghită *et al.*, “Chitosan-Based Biomaterials for Hemostatic Applications: A Review of Recent Advances,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 13. 2023. doi: 10.3390/ijms241310540.
- [128] N. N. Solihat *et al.*, “Recent antibacterial agents from biomass derivatives: Characteristics and applications,” *Journal of Bioresources and Bioproducts*. 2024. doi: 10.1016/j.jobab.2024.02.002.
- [129] J. Xu, K. Liu, W. Chang, B. Sen Chiou, M. Chen, and F. Liu, “Regulating the Physicochemical Properties of Chitosan Films through Concentration and Neutralization,” *Foods*, vol. 11, no. 11, 2022, doi: 10.3390/foods11111657.
- [130] G. O. Akalin, O. Oztuna Taner, and T. Taner, “The preparation, characterization and antibacterial properties of chitosan/pectin silver nanoparticle films,” *Polymer*

*Bulletin*, vol. 79, no. 6, 2022, doi: 10.1007/s00289-021-03667-0.

- [131] M. S. Baburaj, M. G. Veeran, D. Painuly, S. Sreelekshmi, R. J. Rajkumar, and A. S. Aprem, "Fabrication and characterisation of polycaprolactone/gelatin/chitosan (PCL/GEL/CHI) electrospun nano-membranes for wastewater purification," *Desalination*, vol. 563, 2023, doi: 10.1016/j.desal.2023.116709.
- [132] C. Q. Zhou *et al.*, "Biological variation in the estimated glomerular filtration rate of healthy individuals within 24 h calculated using 2021CKD-EPI equations," *Ir J Med Sci*, 2024, doi: 10.1007/s11845-024-03621-9.
- [133] N. Kanani, Rahmayetty, E. Y. Wardhono, and Wardalia, "Preparation and characterization of blend film based on chitosan-poly lactic acid (PLA) composites," in *AIP Conference Proceedings*, 2021. doi: 10.1063/5.0062267.
- [134] D. Santhanes, A. Wilkins, H. Zhang, R. John Aitken, and M. Liang, "Microfluidic formulation of lipid/polymer hybrid nanoparticles for plasmid DNA (pDNA) delivery," *Int J Pharm*, vol. 627, 2022, doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122223.
- [135] M. Ignatova *et al.*, "Bio-Based Electrospun Fibers from Chitosan Schiff Base and Polylactide and Their Cu<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> Complexes: Preparation and Antibacterial and Anticancer Activities," *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 22, 2022, doi: 10.3390/polym14225002.
- [136] A. Vlachopoulos *et al.*, "Poly(Lactic Acid)-Based Microparticles for Drug Delivery Applications: An Overview of Recent Advances," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 2. 2022. doi: 10.3390/pharmaceutics14020359.
- [137] H. Si, P. He, X. Wang, L. Li, and X. Hou, "Metal organic framework/chitosan/polyethylene oxide composite columnar foam as a sorbent for the enrichment and determination of estrogens in environmental aqueous solutions," *New Journal of Chemistry*, vol. 46, no. 2, 2022, doi: 10.1039/d1nj02426d.
- [138] R. Chueachot, V. Promarak, and S. Saengsuwan, "Enhancing antibacterial activity and air filtration performance in electrospun hybrid air filters of chitosan

- (CS)/AgNPs/PVA/cellulose acetate: Effect of CS/AgNPs ratio,” *Sep Purif Technol*, vol. 338, 2024, doi: 10.1016/j.seppur.2024.126515.
- [139] Y. Wu *et al.*, “Optical coherence tomography angiography for the characterisation of retinal microvasculature alterations in pregnant patients with anaemia: A nested case €’control study,” *British Journal of Ophthalmology*, vol. 108, no. 1, 2024, doi: 10.1136/bjo-2022-321781.
- [140] W. Y. Cheah, P. L. Show, I. S. Ng, G. Y. Lin, C. Y. Chiu, and Y. K. Chang, “Antibacterial activity of quaternized chitosan modified nanofiber membrane,” *Int J Biol Macromol*, vol. 126, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.193.
- [141] M. Lacerda *et al.*, “A simple method for Eucalyptus species discrimination: FTIR spectroscopy and machine learning,” *Results Chem*, vol. 7, 2024, doi: 10.1016/j.rechem.2023.101233.
- [142] L. Circelli *et al.*, “Comparison of ATR-FTIR and NIR spectroscopy for identification of microplastics in biosolids,” *Science of the Total Environment*, vol. 916, 2024, doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.170215.
- [143] S. Makaremi, W. Wan, and J. L. Hutter, “Importance of axial stretch on the determination of young’s modulus of electrospun poly(ε-caprolactone) nanofibres by atomic force microscopy,” *Can J Phys*, vol. 99, no. 8, 2021, doi: 10.1139/cjp-2020-0620.
- [144] H. M. Saleh, S. Albukhaty, G. M. Sulaiman, and M. M. Abomughaid, “Design, Preparation, and Characterization of Polycaprolactone–Chitosan Nanofibers via Electrospinning Techniques for Efficient Methylene Blue Removal from Aqueous Solutions,” *Journal of Composites Science*, vol. 8, no. 2, 2024, doi: 10.3390/jcs8020068.
- [145] D. T. Van-Pham, T. Thi Bich Quyen, P. Van Toan, C. N. Nguyen, M. H. Ho, and D. Van Hong Thien, “Temperature effects on electrospun chitosan nanofibers,” *Green Processing and Synthesis*, vol. 9, no. 1, 2020, doi: 10.1515/gps-2020-0050.
- [146] J. Ge *et al.*, “Synthesis, characterization, and antibacterial activity of chitosan-chelated silver nanoparticles,” *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 35, no. 1, 2024, doi:

- 10.1080/09205063.2023.2265629.
- [147] R. Ni, X. Guo, Y. Han, Y. Zhang, D. Li, and Z. Zhang, "Antibacterial Activity of Chitosan Composite Preservative against *Pseudomonas fluorescens*," *Modern Food Science and Technology*, vol. 39, no. 12, 2023, doi: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.1172.
- [148] P. Feng, J. Jia, M. Liu, S. Peng, Z. Zhao, and C. Shuai, "Degradation mechanisms and acceleration strategies of poly (lactic acid) scaffold for bone regeneration," *Mater Des*, vol. 210, 2021, doi: 10.1016/j.matdes.2021.110066.
- [149] W. Tighzert, A. Habi, A. Ajji, T. Sadoun, and F. B. O. Daoud, "Fabrication and characterization of nanofibers based on poly(lactic acid)/chitosan blends by electrospinning and their functionalization with phospholipase A1," *Fibers and Polymers*, vol. 18, no. 3, 2017, doi: 10.1007/s12221-017-6953-x.
- [150] P. Sukum *et al.*, "Argon Plasma Jet-Treated Poly (Vinyl Alcohol)/Chitosan and PEG 400 Plus *Mangifera indica* Leaf Extract for Electrospun Nanofiber Membranes: In Vitro Study," *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 11, 2023, doi: 10.3390/polym15112559.
- [151] A. Toncheva *et al.*, "Antibacterial PLA/PEG electrospun fibers: Comparative study between grafting and blending PEG," *Eur Polym J*, vol. 75, 2016, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2015.12.019.
- [152] M. Mohammadalipour, M. Asadolahi, Z. Mohammadalipour, T. Behzad, and S. Karbasi, "Plasma surface modification of electrospun polyhydroxybutyrate (PHB) nanofibers to investigate their performance in bone tissue engineering," *Int J Biol Macromol*, vol. 230, 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123167.
- [153] S. Radoor, A. Jayakumar, J. Karayil, J. T. Kim, and S. Siengchin, "Biodegradable polymeric green adsorbent for the highly efficient removal of crystal violet dye from aqueous solution," *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 199, 2023, doi: 10.1016/j.cherd.2023.09.048.
- [154] C. Ciarlantini *et al.*, "Development of Antioxidant and Antimicrobial Membranes Based on Functionalized and Crosslinked Chitosan for Tissue Regeneration," *Int J Mol Sci*, vol. 25, no. 4, 2024, doi: 10.3390/ijms25041961.

- [155] L. Shahzadi *et al.*, “An efficient new method for electrospinning chitosan and heparin for the preparation of pro-angiogenic nanofibrous membranes for wound healing applications,” *J Appl Polym Sci*, vol. 139, no. 48, 2022, doi: 10.1002/app.53212.
- [156] A. A. H. Abdellatif, H. N. H. Alturki, and H. M. Tawfeek, “Different cellulosic polymers for synthesizing silver nanoparticles with antioxidant and antibacterial activities,” *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, 2021, doi: 10.1038/s41598-020-79834-6.
- [157] M. Y. Abduh, T. R. Shafitri, M. Jamilah, M. Firmansyah, and R. Manurung, “Chemical and antibacterial properties of chitosan derived from *Mucor spp.*, *Rhizopus. Oryzae* and *Hermetia illucens*,” *J Appl Biol Biotechnol*, vol. 11, no. 6, 2023, doi: 10.7324/JABB.2023.138594.
- [158] O. M. Khubiev, A. R. Egorov, A. A. Kirichuk, V. N. Khrustalev, A. G. Tskhovrebov, and A. S. Kritchenkov, “Chitosan-Based Antibacterial Films for Biomedical and Food Applications,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 13, 2023. doi: 10.3390/ijms241310738.
- [159] N. Muñoz-Tebar, J. A. Pérez-Álvarez, J. Fernández-López, and M. Viuda-Martos, “Chitosan Edible Films and Coatings with Added Bioactive Compounds: Antibacterial and Antioxidant Properties and Their Application to Food Products: A Review,” *Polymers*, vol. 15, no. 2, 2023. doi: 10.3390/polym15020396.
- [160] M. I. Hidayat, M. Adlim, S. Suhartono, Z. Hayati, and N. H. H. A. Bakar, “Comparison of antibacterial properties between chitosan stabilized silver and zinc oxide nanoparticles immobilized on white silica beads,” *S Afr J Chem Eng*, vol. 45, 2023, doi: 10.1016/j.sajce.2023.05.001.
- [161] L. Yildizbakan *et al.*, “Fabrication and Characterisation of the Cytotoxic and Antibacterial Properties of Chitosan-Cerium Oxide Porous Scaffolds,” *Antibiotics*, vol. 12, no. 6, 2023, doi: 10.3390/antibiotics12061004.
- [162] H. Li, Y. Liu, X. Gao, X. Niu, H. Fan, and K. Wang, “Synthesis, characterization and antibacterial properties of chitosan/Ag<sub>2</sub>S/CQDs hydrogel,” *Chemical Papers*, vol. 77, no. 1, 2023, doi: 10.1007/s11696-022-02470-z.

- [163] A. Nejabatdoust, S. D. Mirmiran, A. Salehzadeh, and F. R. Masouleh, “Effective Release of Ciprofloxacin and Rifampicin Antibiotics from Alginate-Chitosan Complex and Its Application Against Clinical Strains of *Staphylococcus aureus*,” *Bionanoscience*, 2023, doi: 10.1007/s12668-023-01262-3.
- [164] Q. M. Nguyen, P. Hutchison, E. Palombo, A. Yu, and P. Kingshott, “Antibiofilm Activity of Eugenol-Loaded Chitosan Coatings against Common Medical-Device-Contaminating Bacteria,” *ACS Appl Bio Mater*, vol. 7, no. 2, 2024, doi: 10.1021/acsabm.3c00949.
- [165] M. Özarıslan, N. H. Avcioglu, D. Bilgili Can, and A. Çalışkan, “Biofilm formation of *C. albicans* on occlusal device materials and antibiofilm effects of chitosan and eugenol,” *Journal of Prosthetic Dentistry*, vol. 131, no. 1, 2024, doi: 10.1016/j.prosdent.2023.10.005.
- [166] C. Vishnupriya, K. Mohamedrizwan, P. R. Arya, S. Vijayakumar, and R. Kavitha, “Evaluation of heavy metal removal and antibiofilm efficiency of biologically synthesized chitosan- silver Nano-bio composite by a soil actinobacterium *Glutamicibacter uratoxydans* VRAK 24,” *Int J Biol Macromol*, vol. 255, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128032.
- [167] O. AL-Fawares, A. Alshweiat, R. O. Al-Khresieh, K. Z. Alzarieni, and A. H. B. Rashaid, “A significant antibiofilm and antimicrobial activity of chitosan-polyacrylic acid nanoparticles against pathogenic bacteria,” *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 32, no. 1, 2024, doi: 10.1016/j.jsps.2023.101918.
- [168] V. Raj, C. J. Raorane, D. Shastri, S. C. Kim, and S. Lee, “Engineering a self-healing grafted chitosan–sodium alginate based hydrogel with potential keratinocyte cell migration property and inhibitory effect against fluconazole resistance *Candida albicans* biofilm,” *Int J Biol Macromol*, vol. 261, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129774.
- [169] D. N. Binjawhar *et al.*, “Upgrading the antibacterial and antibiofilm potential of nanoruthenium via encapsulation by thiazolium ionic liquids-functionalized chitosan film,” *Eur Polym J*, vol. 207, 2024, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2024.112822.

- [170] X. Hu *et al.*, “Preparation and characterization of nisin-loaded chitosan nanoparticles functionalized with DNase I for the removal of *Listeria monocytogenes* biofilms,” *J Food Sci*, vol. 89, no. 4, 2024, doi: 10.1111/1750-3841.16976.
- [171] M. Gouda, M. M. Khalaf, M. F. Abou Taleb, and H. M. Abd El-Lateef, “Fabrication of silver nanoparticles loaded acacia gum/chitosan nanogel to coat the pipe surface for sustainable inhibiting microbial adhesion and biofilm growth in water distribution systems,” *Int J Biol Macromol*, vol. 262, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130085.
- [172] F. Hisham, M. H. Maziaty Akmal, F. Ahmad, K. Ahmad, and N. Samat, “Biopolymer chitosan: Potential sources, extraction methods, and emerging applications,” *Ain Shams Engineering Journal*, vol. 15, no. 2, 2024. doi: 10.1016/j.asej.2023.102424.
- [173] J. V. Ernesto *et al.*, “Physical, chemical, and biological characterization of biodegradable chitosan dressing for biomedical applications: Could sodium bicarbonate act as a crosslinking agent?,” *Mater Chem Phys*, vol. 301, 2023, doi: 10.1016/j.matchemphys.2023.127636.
- [174] S. L. Bee and Z. A. A. Hamid, “Properties of Base Neutralized Chitosan-Hydroxyapatite Biocomposite Membrane,” *Malaysian Journal of Chemistry*, vol. 25, no. 3, 2023, doi: 10.55373/mjchem.v25i3.221.
- [175] F. Soleymani, H. R. Rahimi, H. Farsiani, and A. Jalili, “Antimicrobial Activity of Chitosan Scaffold Loaded with Soluble Factors of Different Probiotic Strains Against Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*,” *Iran J Biotechnol*, vol. 22, no. 1, 2024, doi: 10.30498/ijb.2024.381455.3612.
- [176] D. Chicea, A. Nicolae-Maranciuc, and L. M. Chicea, “Silver Nanoparticles-Chitosan Nanocomposites: A Comparative Study Regarding Different Chemical Syntheses Procedures and Their Antibacterial Effect,” *Materials*, vol. 17, no. 5, 2024, doi: 10.3390/ma17051113.
- [177] Y. Najmalden Ghaibullah Ghaibullah, E. Foto, N. Ozdemir, F. Zilifdar Foto, G. Arslan, and I. Sargin, “Antibacterial potentials of carbon dots immobilized on



- chitosan and glass surfaces,” *Int J Biol Macromol*, vol. 257, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128586.
- [178] K. Fila, B. Podkościelna, and K. Szymczyk, “The application of chitosan as an eco-filler of polymeric composites,” *Adsorption*, vol. 30, no. 2, 2024, doi: 10.1007/s10450-023-00403-0.
- [179] R. Jha and R. A. Mayanovic, “A Review of the Preparation, Characterization, and Applications of Chitosan Nanoparticles in Nanomedicine,” *Nanomaterials*, vol. 13, no. 8, 2023. doi: 10.3390/nano13081302.
- [180] Y. Qi *et al.*, “Self-Assembled Amphiphilic Chitosan Nanomicelles: Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity,” *Biomolecules*, vol. 13, no. 11, 2023, doi: 10.3390/biom13111595.
- [181] L. A. Picos-Corrales *et al.*, “Chitosan as an Outstanding Polysaccharide Improving Health-Commodities of Humans and Environmental Protection,” *Polymers*, vol. 15, no. 3, 2023. doi: 10.3390/polym15030526.
- [182] T. M. Zacaron *et al.*, “Advancements in Chitosan-Based Nanoparticles for Pulmonary Drug Delivery,” *Polymers*, vol. 15, no. 18, 2023. doi: 10.3390/polym15183849.
- [183] M. K. D. Dueholm *et al.*, “Genetic potential for exopolysaccharide synthesis in activated sludge bacteria uncovered by genome-resolved metagenomics,” *Water Res*, vol. 229, 2023, doi: 10.1016/j.watres.2022.119485.
- [184] A. Luraghi, F. Peri, and L. Moroni, “Electrospinning for drug delivery applications: A review,” *Journal of Controlled Release*, vol. 334, 2021. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.03.033.
- [185] H. YUNUS, E. C. SABIR, H. İ. İÇOĞLU, B. YILDIRIM, O. GÜLNAZ, and M. TOPALBEKİROĞLU, “Characterization and Antibacterial Activity of Electrospun Polyethylene oxide/Chitosan Nanofibers,” *Tekstil ve Konfeksiyon*, vol. 33, no. 1, 2023, doi: 10.32710/tekstilvekonfeksiyon.1030386.
- [186] F. Lopresti, V. La Carrubba, S. Campora, and G. Ghersi, “Effect of Chitosan coating on PLA electrospun scaffolds for pre-osteoblastic cells proliferation,” in *Convegno Nazionale di Bioingegneria*, 2023.

- [187] H. HEMMAMI, I. BEN AMOR, A. BEN AMOR, S. ZEGHOUD, S. AHMED, and A. A. ALHAMAD, “Chitosan, Its Derivatives, Sources, Preparation Methods, and Applications: A Review,” *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, vol. 11, no. 1, 2024, doi: 10.18596/jotcsa.1336313.
- [188] N. Fereydouni, M. Zangouei, M. Darroudi, M. Hosseinpour, and A. Gholoobi, “Antibacterial activity of chitosan-polyethylene oxide nanofibers containing silver nanoparticles against aerobic and anaerobic bacteria,” *J Mol Struct*, vol. 1274, 2023, doi: 10.1016/j.molstruc.2022.134304.
- [189] Z. Liu, Y. Lv, G. Zheng, W. Wu, and X. Che, “Chitosan/Poly(lactic Acid) Nanofibers Containing Astragaloside IV as a New Biodegradable Wound Dressing for Wound Healing,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 24, no. 7, 2023, doi: 10.1208/s12249-023-02650-4.
- [190] A. Rezazadeh Nochehdehi, F. Nemavhola, and S. Thomas, “Structure, function, and biomechanics of meniscus cartilage,” in *Cartilage Tissue and Knee Joint Biomechanics: Fundamentals, Characterization and Modelling*, 2023. doi: 10.1016/B978-0-323-90597-8.00020-7.
- [191] G. Harini, R. Bharathi, A. Sankaranarayanan, A. Shanmugavadivu, and N. Selvamurugan, “Nanoceramics-reinforced chitosan scaffolds in bone tissue engineering,” *Materials Advances*, vol. 4, no. 18, 2023. doi: 10.1039/d3ma00422h.
- [192] Y. A. Hamdan *et al.*, “Chitosan-based biomaterials for tissue engineering of glial cells,” in *Physiology and Function of Glial Cells in Health and Disease*, 2023. doi: 10.4018/978-1-6684-9675-6.ch021.
- [193] M. Szulc and K. Lewandowska, “Biomaterials Based on Chitosan and Its Derivatives and Their Potential in Tissue Engineering and Other Biomedical Applications—A Review,” *Molecules*, vol. 28, no. 1, 2023. doi: 10.3390/molecules28010247.
- [194] I. Aranaz, F. Navarro-García, M. Morri, N. Acosta, L. Casettari, and A. Heras, “Evaluation of chitosan salt properties in the production of AgNPs materials with antibacterial activity,” *Int J Biol Macromol*, vol. 235, 2023, doi:

- 10.1016/j.ijbiomac.2023.123849.
- [195] M. M. El-Zahed, Z. A. M. Baka, M. I. Abou-Dobara, and A. K. A. El-Sayed, "Biogenic Synthesis of Chitosan/Silver Nanocomposite by *Escherichia coli* D8 (MF062579) and its Antibacterial Activity," *Jordan J Biol Sci*, vol. 16, no. 2, 2023, doi: 10.54319/jjbs/160212.
- [196] P. Sharma *et al.*, "Accelerated in-vivo infected dermal wound healing with antimicrobial Bio-nanocomposite hydrogel," *Alexandria Engineering Journal*, vol. 88, 2024, doi: 10.1016/j.aej.2023.12.059.
- [197] F. M. Aldakheel, D. Mohsen, M. M. El Sayed, K. A. Alawam, A. K. S. Binshaya, and S. A. Alduraywish, "Silver Nanoparticles Loaded on Chitosan-g-PVA Hydrogel for the Wound-Healing Applications," *Molecules*, vol. 28, no. 7, 2023, doi: 10.3390/molecules28073241.
- [198] L. J. Muiz, A. L. Juwono, Z. Paputungan, and Y. K. Krisnandi, "Antibacterial Testing on Silver/Zinc Oxide Nanoparticles/Organoclay Reinforced Chitosan Biocomposites," *Makara J Sci*, vol. 27, no. 3, 2023, doi: 10.7454/mss.v27i3.2114.
- [199] S. Mandal, S. Hwang, S. B. Marpu, M. A. Omary, V. Prybutok, and S. Q. Shi, "Bioinspired Synthesis of Silver Nanoparticles for the Remediation of Toxic Pollutants and Enhanced Antibacterial Activity," *Biomolecules*, vol. 13, no. 7, 2023, doi: 10.3390/biom13071054.
- [200] Z. A. Alhulaybi, "Fabrication and Characterization of Poly(lactic acid)-Based Biopolymer for Surgical Sutures," *ChemEngineering*, vol. 7, no. 5, 2023, doi: 10.3390/chemengineering7050098.
- [201] A. Aziz Shaikh *et al.*, "Biopolymer-based nanocomposites for application in biomedicine: a review," *Journal of Polymer Engineering*, vol. 44, no. 2, 2024, doi: 10.1515/polyeng-2023-0166.
- [202] F. Dilnawaz, S. Acharya, and A. Kanungo, "A clinical perspective of chitosan nanoparticles for infectious disease management," *Polymer Bulletin*, vol. 81, no. 2, 2024, doi: 10.1007/s00289-023-04755-z.
- [203] G. J. Kim, L. Kim, and O. S. Kwon, "Application of 3D Bioprinting Technology

- for Tissue Regeneration, Drug Evaluation, and Drug Delivery,” *Applied Science and Convergence Technology*, vol. 32, no. 1. 2023. doi: 10.5757/ASCT.2023.32.1.1.
- [204] M. Kim, “Antiseptics and Cleansing the Chronic Wound: Best Practice,” *Journal of Wound Management and Research*, vol. 19, no. 1. 2023. doi: 10.22467/jwmr.2023.02404.
- [205] C. Wu *et al.*, “Biosynthesis and properties of AgNPs/chitosan composite antibacterial agent,” *Fuhe Cailiao Xuebao/Acta Materiae Compositae Sinica*, vol. 40, no. 10, 2023, doi: 10.13801/j.cnki.fhclxb.20230117.003.
- [206] Z. Li *et al.*, “Mechanical and Antibacterial Properties of Bone Cement Composites Containing Silver Nanoparticles Compounded with Various Types of Chitosan,” *J Biomater Tissue Eng*, vol. 13, no. 9, 2024, doi: 10.1166/jbt.2023.3323.
- [207] N. Zerrouk, R. Alcraft, B. A. Hall, F. Augé, and A. Niarakis, “Large-scale computational modelling of the M1 and M2 synovial macrophages in rheumatoid arthritis,” *NPJ Syst Biol Appl*, vol. 10, no. 1, 2024, doi: 10.1038/s41540-024-00337-5.
- [208] T. Rauchenwald *et al.*, “Preadipocytes in human granulation tissue: role in wound healing and response to macrophage polarization,” *Inflamm Regen*, vol. 43, no. 1, 2023, doi: 10.1186/s41232-023-00302-5.
- [209] J. Li, H. Chou, L. Li, H. Li, and Z. Cui, “Wound healing activity of neferine in experimental diabetic rats through the inhibition of inflammatory cytokines and nrf-2 pathway,” *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 48, no. 1, 2020, doi: 10.1080/21691401.2019.1699814.
- [210] S. Al-Maawi *et al.*, “Multinucleated giant cells induced by a silk fibroin construct express proinflammatory agents: An immunohistological study,” *Materials*, vol. 14, no. 14, 2021, doi: 10.3390/ma14144038.
- [211] A. Hasmann *et al.*, “Analysis of myeloperoxidase activity in wound fluids as a marker of infection,” *Ann Clin Biochem*, vol. 50, no. 3, 2013, doi: 10.1258/acb.2011.010249.

- [212] F. Zhao *et al.*, “Effect of small molecular weight soybean protein-derived peptide supplementation on attenuating burn injury-induced inflammation and accelerating wound healing in a rat model,” *RSC Adv*, vol. 9, no. 3, 2019, doi: 10.1039/C8RA09036J.
- [213] G. J. Kotwal, M. Martin, E. M. Hattab, and S. Chien, “Characterization of ATP nanoliposome treatment for regeneration of injured spinal cord,” in *Nanotechnology Characterization Tools for Tissue Engineering and Medical Therapy*, 2019. doi: 10.1007/978-3-662-59596-1\_10.
- [214] R. Guo, S. Li, H. Xia, Z. Feng, Q. Tang, and C. Peng, “Effects of Myeloperoxidase on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*-Colonized Burn Wounds in Rats,” *Adv Wound Care (New Rochelle)*, vol. 8, no. 7, 2019, doi: 10.1089/wound.2018.0865.

## ДОДАТКИ

*Додаток А**Наукові праці, опубліковані за темою дисертації*

1. Samokhin Y., Varava Y., Diedkova K., Yanko I., Husak Y., Radwan-Pragłowska J., Pogorielova O., Janus Ł., Pogorielov M., Korniienko V. Fabrication and Characterization of Electrospun Chitosan/Polylactic Acid (CH/PLA) Nanofiber Scaffolds for Biomedical Application. *Journal of Functional Biomaterials*. 2023. №14. 414. DOI: 10.3390/jfb14080414.
2. Korniienko V., Husak Y., Radwan-Pragłowska J., Holubnycha V., Samokhin Y., Yanovska A., Varava Y., Diedkova K., Janus Ł., Pogorielov M. Impact of Electrospinning Parameters and Post-Treatment Method on Antibacterial and Antibiofilm Activity of Chitosan Nanofibers. *Molecules*. 2022. №27. 3343. DOI: 10.3390/molecules27103343.
3. Korniienko V., Husak Ye., Yanovska A., Altundal S., Diedkova K., Samokhin Ye., Varava Y., Holubnycha V., Pogorielov M. Biological behavior of chitosan electrospun nanofibrous membranes after different neutralization methods. *Prog. Chem. Appl. Chitin and its Deriv.* 2022. No 27. P. 135-153. DOI: 10.15259/PCACD.27.010.
4. Diedkova K., Roshchupkin A., Varava Y., Samokhin Y., Zahorodna V., Gogotsi O., Baginskiy I., Pogorielov M., Kornienko V., Kyrylenko S. The Multistep Process of Coating PCL Membranes with MXene Solution. *Proceedings of the 2022 IEEE 12th International Conference "Nanomaterials: Applications and Properties", NAP 2022 (2022)*. DOI: 10.1109/NAP55339.2022.9934231.
5. Varava Y., Samokhin Y., Savchenko A., Diedkova K., Kyrylenko S., Korniienko V. Antimicrobial Electrospun Chitosan Nanofibrous Membranes Functionalized with Silver Nanoparticles. *Proceedings of the 2021 IEEE 11th International Conference "Nanomaterials: Applications and Properties", NAP 2021, 2021*. doi: 10.1109/nap51885.2021.9568584.
6. Samokhin Y., Varava Y. Antibacterial activity of electrospun chitosan/polylactic acid nanofibers loaded with silver nanoparticles. *ABSTRACT BOOK BIOMEDICAL*

PERSPECTIVES International Medical Conference; 2024.

7. Samokhin Y., Diedkova K., Varava Y., et al. Fabrication and Characterization of Electrospun Chitosan/Poly(lactic Acid) (CH/PLA) NanoFiber Scaffolds for Biomedical Application. Book of Abstracts of International conference "YUCOMAT-2023". Herceg Novi. Montenegro. September 4-8, 2023.
8. Korniienko V., Husak Y., Samokhin Y., Varava J., Diedkova K. Chitosan electrospun nanofibers: surface morphology and hydrophobicity after different crosslinking. 80th International Scientific Conference of the University of Latvia. Latvian University. Riga, Latvia, February 10-11, 2022. p.19.
9. Korniienko V., Samokhin Y., Varava Y., Diedkova K. Processing and characterization of hybrid chitosan (Ch)/poly(lactic acid) (PLA) composite nanofibrous scaffolds for biomedical application. Book of Abstracts of International conference "YUCOMAT-2022". Herceg Novi. Montenegro. August 29 – September 2, 2022. p. 153.
10. Samokhin Y., Varava Y., Savchenko A., Korniienko V. Chitosan electrospun membranes with antibacterial properties biomedical applications. 18th International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors. Medical University. Pleven, Bulgaria. 13-th–18-th September, 2021. p. 78.
11. Samokhin Y., Diedkova K., Varava Y. Characteristics of electrospun chitosan nanofibrous membranes with different solvents. ABSTRACT BOOK BIOMEDICAL PERSPECTIVES III International Medical Conference; 2021. p. 88.

**Апробація результатів дисертації**

1. Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» (Суми, 2021).
2. Міжнародна конференція «Nanomaterials for biosensors and biomedical application» (Рига, Латвія, 2022).
3. Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» (Суми, 2024).
4. Міжнародна конференція «YUCOMAT» (Чорногорія, 2022).
5. Міжнародна медична конференція для студентів та молодих лікарів (Плевен, Болгарія, 2021).
6. Міжнародна конференція «Nanomaterials: Applications & Properties» (Одеса, 2021).
7. Міжнародна конференція «Nanomaterials: Applications & Properties» (Краків, 2022).
8. Міжнародна конференція «YUCOMAT» (Чорногорія, 2023).



## Копії актів впровадження

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Перший проректор з науково -  
педагогічної роботи  
Полтавського державного медичного  
університету  
Валентин ДВОРНИК

« 17 » травня 2024 р.

## АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження (метод профілактики, лікування, пристрій, форма організаційної праці, тощо).** Визначення впливу параметрів процесу електропрядіння хітозанових нановолокнистих мембран на їх антибактеріальні та антиадгезивні властивості.

2. **Установа-розробник:** Навчально-науковий медичний інститут Сумського державного університету.

3. **Ким запропоновано:** Самохін Євген Олександрович, аспірант кафедри морфології.

4. **Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертації, монографії, матеріали з'їздів, наукових конференцій, семінарів та ін.).** Korniienko V., Husak Y., Radwan-Pragłowska J., Holubnycha V., Samokhin Y., Yanovska A., Varava Y., Diedkova K., Janus L., Pogorielov M. Impact of Electrospinning Parameters and Post-Treatment Method on Antibacterial and Antibiofilm Activity of Chitosan Nanofibers. Molecules. 2022. №27. 3343. DOI: 10.3390/molecules27103343.

5. **Результати застосування методу за період з вересня 2023 р. по квітень 2024 р.:** Впровадження у навчальний процес на кафедрі патологічної анатомії та судової медицини Полтавського державного медичного університету в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі здобувачами вищої освіти, лікарями-інтернами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.

6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3):** Поглиблення знань здобувачів вищої освіти, лікарів-інтернів з питань антибактеріальних та антиадгезивних властивостей нановолокнистих мембран.

8. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Пропозиція обговорена та затверджена на кафедральному засіданні (протокол № 17 від 17 травня 2024 року).

**Відповідальний за впровадження**  
завідувач кафедри  
патологічної анатомії та судової медицини  
Полтавського державного  
медичного університету  
к. мед. н., доцент

Олексій ПРИЛУЦЬКИЙ



**АКТ**  
впровадження (використання) результатів  
дисертаційної роботи у навчальний процес

**Оцінка біосумісності та антибактеріальної ефективності тривимірних волокнистих матеріалів з інкорпорованими наночастинками**

яка виконана в період з 1 жовтня 2020 р. по 30 вересня 2024 р.

розроблено Спосіб отримання хітозанової нановолокнистої мембрани модифікованої наночастинками срібла

Здобувач наукового ступеня доктора філософії Самохін Євген Олександрович  
Комісія в складі:

Голова комісії: голова ради з якості ННМІ, доцент кафедри педіатрії Вікторія ПЕТРАШЕНКО

Члени комісії<sup>2)</sup>: гарант освітньої програми- професор кафедри акушерства, Ірина НІКІТІНА  
гінекології та планування сім'ї

завідувач кафедри патологічної анатомії Анатолій РОМАНЮК

професор кафедри морфології Максим ПОГОРЕЛОВ

Встановила, що результати науково-дослідної роботи використовуються в навчальному процесі за освітньою програмою \_\_\_\_\_

(назва програми)

освітнього ступеня доктор філософії спеціальності ОНП 222 – Медицина

шляхом реалізації наступного<sup>3)</sup> : використання методів навчання, заснованих на дослідженнях

21 червня 2024 р.

Голова комісії:

Вікторія ПЕТРАШЕНКО

Члени комісії:

Ірина НІКІТІНА

(підпис)

Анатолій РОМАНЮК

(підпис)

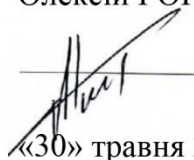
Максим ПОГОРЕЛОВ

(підпис)



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Центру  
Матеріалознавства  
Олексій ГОГОЦЬ




«30» травня 2024 року

### АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження (метод профілактики, лікування, пристрій, форма організаційної праці, тощо).** Спосіб обробки (нейтралізації) розчином гідроксиду натрію електропрядених хітозанових нановолокнистих мембран.
2. **Установа-розробник:** Навчально-науковий медичний інститут Сумського державного університету.
3. **Ким запропоновано:** Самохін Євген Олександрович, аспірант кафедри морфології.
4. **Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертації, монографії, матеріали з'їздів, наукових конференцій, семінарів та ін.).** Korniienko V., Husak Ye., Yanovska A., Altundal S., Diedkova K., Samokhin Ye., Varava Y., Holubnychya V., Pogorielov M. Biological behavior of chitosan electrospun nanofibrous membranes after different neutralization methods. Prog. Chem. Appl. Chitin and its Deriv. 2022. No 27. P. 135 – 153. DOI: 10.15259/PCACD.27.010.
5. **Впроваджено.** У виробничий процес.
6. **Термін впровадження:** 2023-2024 р.
7. **Ефективність впровадження.** Впроваджено як метод постелектропряденої обробки хітозанових нановолокнистих мембран з метою покращення їх якості.
8. **Місце впровадження:** м. Київ
9. **Зауваження, пропозиції:** немає.

**Відповідальний за впровадження:** Директор  
Олексій ГОГОЦЬ

