

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ «МИСИС»

На правах рукописи

Пермякова Елизавета Сергеевна

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ ПОКРЫТИЯ
ПОЛИКАПРОЛАКТОНОВЫХ СУБМИКРОННЫХ ВОЛОКОН ДЛЯ
МЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ**

Специальность 2.6.6 – «Нанотехнологии и наноматериалы»

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук,
Штанский Дмитрий Владимирович

Москва – 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1 Применение субмикронных волокон для биомедицинских приложений.....	12
1.1.1 Фильтрационные приложения нано- и субмикронных волокон	14
1.1.2 Нано- и субмикронные волокна для костной регенерации.....	21
1.1.3 Нано- и субмикронные волокна для заживления ран.....	25
1.2 Поверхностная модификация нано- и субмикронных волокон для медицинских применений	29
1.2.1 Модификация субмикронных волокон в низкотемпературной плазме (НТП).....	30
1.2.2 Магнетронное распыление мишени на поверхность нано- и субмикронных волокон	35
1.3 Выводы из литературного обзора.....	39
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1 Синтез ПКЛ волокон	41
2.2 Разработка метода получения и оптимизация химического состава плазменно-осажденных полимерных пленок из смеси газов $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4/\text{Ag}$	42
2.3 Оптимизация процесса плазменного осаждения полимерных пленок из смеси газов $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4/\text{Ag}$ на поверхность термочувствительных волокон ПКЛ.....	43
2.4 Распыление композитной мишени $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ на поверхность ПКЛ волокон	44
2.5 Химическая дериватизация для определения количества карбоксильных групп в составе плазменно-осажденного полимерного покрытия	44
2.6 Изучение состава и структуры покрытий	45
2.7 Методика изучения смачиваемости поверхности покрытий	45
2.8 Методика исследования биоактивности покрытий в растворе, моделирующем внутреннюю среду организма.....	46
2.9 Методика исследования биоактивности покрытий за счет определения активности щелочной фосфатазы	46
2.10 Изучение механических характеристик волокон ПКЛ, ПКЛ- COOH , ПКЛ- TiCaPCON	47
2.11 Методика электростатического присоединения гентамицина к поверхности плазменно-модифицированных скаффолдов ПКЛ- COOH	48
2.12 Методика ковалентного присоединения гентамицина к поверхности плазменно-модифицированных волокон ПКЛ- COOH	48
2.13 Методика изучения кинетики выхода антибиотика гентамицина в раствор.....	49
2.14 Введение ионов Ag в состав TiCaPCON -покрытых ПКЛ скаффолдов	49
2.15 Теоретическое моделирование распределения ионов серебра в составе TiCaPCON -покрытых волокон ПКЛ скаффолдов	50
2.16 Синтез и характеристика наночастиц ZnO	50
2.17 Получение композитных материалов ПКЛ- ZnO	51
2.18 Методика изучения кинетики выхода ионов серебра/цинка в раствор.....	51
2.19 Методика исследования биосовместимости образцов.....	51
2.20 Методика исследования антибактериальной активности ПКЛ волокон с терапевтическим агентом.....	52
ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ ПКЛ ВОЛОКОН И ОСАЖДЕНИЕ БИОАКТИВНЫХ ПОКРЫТИЙ НА ИХ ПОВЕРХНОСТЬ	54

3.1 Синтез ПКЛ скаффолдов	54
3.2 Изучение химического состава и стабильности плазменно-осажденных полимерных покрытий из смеси газов $\text{Ar}/\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4$. Оптимизация режима осаждения карбоксил-содержащего покрытия на ПКЛ волокна (ПКЛ- COOH).....	56
3.3 Напыление биоактивного покрытия TiCaPCON на поверхность ПКЛ волокон (ПКЛ- TiCaPCON)	66
3.4 Смачиваемость поверхности покрытий	70
3.5 Сравнение механических характеристик образцов ПКЛ, ПКЛ- COOH и ПКЛ- TiCaPCON	70
3.6 Исследование биоактивности образцов ПКЛ, ПКЛ- COOH и ПКЛ- TiCaPCON за счет выдержки в растворе, имитирующем внутреннюю среду организма	72
3.7 Изучение биоактивности образцов ПКЛ, ПКЛ- COOH и ПКЛ- TiCaPCON по анализу активности щелочной фосфатазы	76
3.8 Исследование биосовместимости образцов ПКЛ, ПКЛ- COOH и ПКЛ- TiCaPCON	77
3.9 Выводы по третьей главе	79
ГЛАВА 4. ВВЕДЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНЫХ АГЕНТОВ В СОСТАВ ПКЛ ВОЛОКОН.....	81
4.1 Получение гентамицин-модифицированных волокон ПКЛ.....	81
4.1.1 Иммобилизация антибиотика гентамицина на поверхность плазменно-обработанных ПКЛ волокон	81
4.1.2 Кинетика высвобождения антибиотика гентамицина из гентамицин-модифицированных ПКЛ волокон	89
4.1.3 Антибактериальная активность гентамицин-модифицированных ПКЛ волокон.....	90
4.1.4 Биосовместимость гентамицин-модифицированных ПКЛ волокон	92
4.2 Получение нанокомпозитных материалов на основе ПКЛ волокон	94
4.2.1 Ионная имплантация серебра в состав волокон ПКЛ- TiCaPCON	94
4.1.2 Формирование наночастиц Ag_2O на поверхности ПКЛ- COOH	99
4.1.3 Иммобилизация наночастиц оксида цинка на поверхности ПКЛ- COOH	105
4.3 Выводы по главе 4	111
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ ПО РАБОТЕ.....	113
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	117
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	136
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	140
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	142
ПРИЛОЖЕНИЕ 5	146
ПРИЛОЖЕНИЕ 6	148
ПРИЛОЖЕНИЕ 7	151

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей диссертации применяют следующие сокращения и обозначения:

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;

ИВЛ – искусственная вентиляция легких;

ПКЛ – поликапролактон;

ВКМ – внеклеточный матрикс;

pH – показатель кислотности;

ВЧ – высокочастотное;

TiCaPCON – покрытие полученное при магнетронном распылении композиционной мишени состава $TiC + 10 \% Ca_3(PO_4)_2$ в атмосфере азота;

MPPS – most penetrated particle size, размер наиболее проникающих частиц;

PM – particulate matter, твердые частицы;

ПЭО – полиэтилен оксид;

ПАН – полиакрилонитрил;

ПВДФ – поливинилиденфторид;

ПП – полипропилен;

ПБИ – полибензимидазол;

ПС – полистирол;

ПИ – полиимид;

ПС – полистирол;

ГАП – гидроксиапатит;

ВКМ – внеклеточный матрикс;

SBF – simulated body fluid, моделируемая жидкость организма;

ТКФ – трикальций фосфат;

ТРКФ – тетракальций фосфат;

ПТФЭ – политетрафторэтилен;

АПФ – аморфный пирофосфат кальция;

ДГОФК – дигидрат гидроортофосфата кальция;

Кол – коллаген;

hFOB – human fetal osteoblast cell line, фетальные остеобласты человека;

CTGF – connective tissue growth factor, фактор роста соединительной ткани;

МСК – мезенхиальные стволовые клетки;

ХЗ – хитозан;

ПВС – поливиниловый спирт;

НТП – низкотемпературная плазма;

НЧ – низкочастотное излучение;

СВЧ – сверхвысокочастотное излучение;

БР – барьерный разряд;

ФР – физиологический раствор ($C(\text{NaCl}) = 9 \text{ г/л}$);

ат.% - атомная доля, %;

РФЭС – рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия;

ЭДС – энерго-дисперсионной спектроскопия;

ТФЭ – трифторэтанол;

FWHM – полная ширина на половине максимума;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;

ГМ – гентамицин;

ДЦК – дициклогексилкарбодиимид;

ЩФ – щелочная фосфатаза;

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор;

ИСП МС – масс-спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой;

ex/em – excitation/emission, возбуждение/испускание;

ATR – FTIR – ИК спектры ослабленного полного отражения с преобразованием Фурье;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно регистрируется более 1,2 миллиона смертей, обусловленных инфекциями, вызванными патогенами, устойчивыми к антибиотикам [1]. Антибиотикорезистентные штаммы бактерий представляют серьёзную клиническую проблему в лечении хронически инфицированных ран, при регенерации костной ткани, а также при развитии нозокомиальных инфекций у пациентов, находящихся на искусственной вентиляции лёгких (ИВЛ). Это значительно увеличивает длительность госпитализации, повышает риск летальных исходов и оказывает существенное экономическое давление на системы здравоохранения.

В этих условиях актуальным является разработка новых материалов с антимикробными свойствами. Нано- и субмикронные волокна на основе поликапролактона (ПКЛ), полученные методом электроформования, рассматриваются как перспективные материалы для медицинских применений благодаря совокупности физико-химических и биологических характеристик: высокой удельной поверхности, биосовместимости, достаточной механической прочности и биodeградируемости в физиологических условиях. Нетканые материалы из таких волокон отличаются высокой пористостью и воздухопроницаемостью, что обеспечивает эффективную фильтрацию аэрозольных частиц и биологических агентов, включая вирусы и бактерии [2]. Структурная архитектура электроформованных волокон, имитирующая естественную организацию внеклеточного матрикса, способствует адгезии, пролиферации и дифференцировке клеток, что делает их перспективными для применения в регенеративной медицине — в частности, при восстановлении костной, хрящевой, нервной и кожной тканей. Кроме того, данные материалы могут использоваться в системах локальной доставки лекарственных средств, включая терапию онкологических заболеваний и лечение хронических ран, а также в качестве фильтрующих слоев для очистки воздуха от микробиологических и аэрозольных загрязнений.

Для расширения функциональных возможностей и повышения эффективности применения ПКЛ-волокон в биомедицинских целях актуальной задачей является придание им антимикробной активности [3]. Современные тенденции в развитии медицинских технологий требуют создания материалов, способных эффективно подавлять рост патогенных микроорганизмов, особенно на фоне растущей устойчивости к традиционным антибиотикам.

Одним из перспективных направлений является разработка антибактериальных покрытий, обеспечивающих локальное и пролонгированное действие. При этом ключевыми параметрами являются ёмкость загрузки терапевтического агента и кинетика его высвобождения. Инкорпорация биоактивных соединений может осуществляться как на поверхности материала (путём физической адсорбции, электростатического взаимодействия или ковалентного связывания), так и в объём полимерной матрицы (например, методом ионной имплантации). Физическая адсорбция, несмотря на простоту реализации, характеризуется слабыми межмолекулярными взаимодействиями, что приводит к быстрому «выбросу» активного вещества в начальный период эксплуатации и не обеспечивает длительного терапевтического эффекта. Электростатическое связывание позволяет увеличить объём загрузки и замедлить высвобождение, однако такие системы чувствительны к изменениям pH среды и недостаточно стабильны в физиологических условиях. Ковалентная иммобилизация терапевтических агентов является более предпочтительной стратегией, поскольку обеспечивает прочную фиксацию активных молекул на поверхности, препятствуя адгезии планктонных бактерий и снижая риск формирования биоплёнок [4].

Для реализации ковалентного или электростатического присоединения терапевтических агентов к поверхности необходимо наличие активных функциональных групп. Одним из эффективных подходов к созданию таких групп на поверхности полимерных материалов является плазмохимическое осаждение полимерных покрытий. Данный метод позволяет формировать ультратонкие (толщиной менее 100 нм) и стабильные покрытия с высокой адгезией к подложке, а также обеспечивает возможность модификации объектов сложной геометрии. Технология отличается высокой воспроизводимостью и возможностью обработки широкого спектра материалов, включая термочувствительные полимеры.

Альтернативным подходом к обеспечению антимикробных свойств является использование наночастиц на основе биоцидных металлов и их оксидов (Ag, Ag₂O, ZnO и др.), способных к контролируемому высвобождению ионов, обладающих выраженным бактерицидным действием. Методы магнетронного напыления и ионной имплантации позволяют эффективно внедрять такие наночастицы в состав материалов, однако их применение ограничено в случае термочувствительных полимеров вследствие возможной деградации матрицы. Таким образом, разработка устойчивых, биосовместимых и функционально эффективных антибактериальных покрытий на основе ПКЛ-волокон требует тщательного подбора методов модификации и оптимизации технологических параметров.

Цель диссертационной работы:

Целью работы является разработка способов модификации волокон ПКЛ для повышения биоактивных свойств методами плазмохимического осаждения из газовой фазы (*метод 1*) и формирование биоактивного покрытия магнетронным распылением композиционной мишени состава $\text{TiC} + 10\% \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (*метод 2*), а также разработки методов получения антибактериальных материалов за счет введения в состав бактерицидных агентов (гентамицина (*метод 3*) и наночастиц $\text{Ag}_2\text{O}/\text{ZnO}$ (*методы 4-6*))

Для достижения поставленной цели в работе решались **следующие задачи:**

1) Разработка технологического режима получения субмикронных волокон поли-ε-капролактона (ПКЛ) методом электроформования, обеспечивающего оптимальное распределение диаметра волокон в диапазоне 50–500 нм, соответствующее структуре внеклеточного матрикса;

2) Разработка методики формирования биоактивного покрытия на поверхности термочувствительных субмикронных волокон ПКЛ (ПКЛ-СООН) путем низкотемпературного высокочастотного (ВЧ, 13.56 МГц) плазмохимического осаждения карбоксилсодержащих полимерных покрытий из смеси газов $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4/\text{Ar}$ при пониженном давлении ($P \leq 10^{-3}$ Па). Выяснение закономерности влияния соотношения компонентов газовой смеси на химический состав и стабильность покрытий в воздухе и воде при различных значениях pH;

3) Разработка режимов нанесения биоактивного покрытия на поверхность ПКЛ волокон методом магнетронного распыления композиционной мишени состава $\text{TiC} + 10\% \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и проведение комплексного структурно-химического анализа модифицированных волокон ПКЛ- TiCaPCON ;

4) Определение биоактивных свойств модифицированных волокон ПКЛ-СООН и ПКЛ- TiCaPCON в среде, моделирующей внутреннюю среду организма (SBF), а также путем оценки активности щелочной фосфатазы *in vitro*;

5) Разработка методов введения гентамицина (ГМ) в состав волокон ПКЛ-СООН (*метод 3*) путем формирования *пептидных и/или ионных связей*. Проведение комплексного структурно-химического анализа поверхности модифицированных волокон ПКЛ- $\text{ГМ}_{\text{ков}}/\text{ПКЛ-ГМ}_{\text{ион}}$ и изучение кинетики выхода гентамицина;

6) Разработка метода формирования наночастиц серебра в волокнах ПКЛ- TiCaPCON методом ионной имплантации. Проведение комплексного структурно-химического анализа полученных композитных волокон ПКЛ- TiCaPCON-Ag и изучение кинетики выхода ионов серебра. Моделирование распределения серебра в составе материала с использованием программного пакета SRIM-2013 (*метод Монте-Карло*);

7) Разработка технологии получения композитных волокон ПКЛ с наночастицами Ag_2O и ZnO , иммобилизованными на поверхности COOH -покрытия за счет электростатических взаимодействий. Проведение комплексного структурно-химического анализа полученных композитных волокон и изучение кинетики выхода бактерицидных ионов;

8) Изготовление макетных образцов и проведение биологических испытаний *in vitro*; оценка антибактериальной активности, биосовместимости, биоактивности. Анализ полученных результатов и установление связи биологических свойств с разработанными способами модификации поверхности.

Научная новизна результатов исследования

1) Впервые установлены закономерности влияния скорости потоков и состава смеси $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4/\text{Ar}$ на химический состав плазменно-осаждаемого карбоксилсодержащего полимерного покрытия. Показано, что увеличение доли CO_2 в газовой смеси приводит к росту содержания активных карбоксильных групп в составе осаждаемого покрытия, при этом общее количество сложноэфирных и карбоксильных групп достигает насыщения при соотношении $R = 0.39$ (где R рассчитывается по соотношению скорости потоков (Q) реакционных газов: $R = Q(\text{CO}_2) / [Q(\text{CO}_2) + Q(\text{C}_2\text{H}_4)]$). Установлено, что плазменно-осажденный полимер стабилен в нейтральной среде и деградирует в кислой и щелочной средах;

2) Впервые получены и исследованы композитные материалы на основе поли-ε-капролактоновых волокон с покрытием TiCaPCON и имплантированные ионами серебра (ПКЛ- TiCaPCON-Ag), предназначенные для применения в костной тканевой инженерии. Определена оптимальная концентрация ионов Ag , обеспечивающая эффективный локальный антибактериальный эффект без снижения биосовместимости материала;

3) Методами ИК-спектроскопии, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) экспериментально подтверждено образование кальцийсодержащих фаз на поверхности модифицированных волокон ПКЛ- COOH и ПКЛ- TiCaPCON после выдержки в растворе, имитирующем биологическую среду организма (SBF). Полученные данные свидетельствуют о проявлении биоактивных свойств разработанных материалов *in vitro*;

4) Разработаны нанокомпозитные покрытия с высокой антипатогенной активностью за счет формирования иммобилизованных наночастиц Ag_2O на поверхности волокон ПКЛ с плазменно-осажденным карбоксилсодержащим полимерным покрытием. Полученные волокна проявляют контролируемое высвобождение ионов серебра и могут быть

использованы для разработки антибактериальных биоматериалов нового поколения.

Практическая значимость работы

1) Разработаны и оптимизированы технологические режимы электроформования наноструктурированных волокнистых материалов из поликапролактона (ПКЛ) с контролируемым диаметром волокон 260 ± 60 нм, что соответствует морфологическим характеристикам внеклеточного матрикса. Полученные материалы перспективны для применения в качестве биоскаффолдов в тканевой инженерии и фильтрации воздушных потоков.

2) Впервые разработаны технологии нанесения биоактивных и антибактериальных покрытий (COOH, TiCaPCON, TiCaPCON-Ag) на поверхность термолабильных ПКЛ-волокон методами плазмохимического осаждения и магнетронного распыления. Режимы обработки зарегистрированы в виде объекта промышленной собственности — ноу-хау №02–457–2020 «Плазменная обработка термочувствительных нановолокнистых скаффолдов» в депозитарии НИТУ «МИСиС» от 20.04.2020.

3) Разработанные покрытия на поверхности ПКЛ-волокон способствуют улучшению взаимодействия с клетками остеобластов (MC3T3-E1) и эпителиальных клеток (IAR-2), а также имеют выраженный антимикробный эффект в отношении широкого спектра патогенных микроорганизмов. Наиболее высокой антибактериальной активностью обладают нанокompозитные материалы с электростатически иммобилизованными наночастицами $\text{Ag}_2\text{O}/\text{ZnO}$, что открывает возможность их применения в качестве самоочищающихся фильтрующих элементов для газов медицинского и промышленного назначения.

Достоверность полученных результатов диссертационной работы подтверждается использованием современного сертифицированного научно-исследовательского оборудования с применением специализированного программного обеспечения и аттестованных методик исследований согласно межгосударственным стандартам, сопоставлением значительного количества теоретических и экспериментальных данных между собой, а также с опубликованными результатами других авторов в научных журналах.

Личный вклад автора. На всех этапах выполнения диссертационной работы автор принимал непосредственное участие в постановке задач исследований, в планировании и методическом обеспечении экспериментов, в проведении большинства экспериментальных измерений и теоретических расчетов, в анализе полученных результатов и формулировании выводов.

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в 15 публикациях,

в том числе в 7 статьях, опубликованных в журналах из перечня, рекомендованного ВАК и/или индексируемых WoS/Scopus, в 7 тезисах и материалах докладов научных конференций, в 1 ноу-хау, зарегистрированном в Депозитарии ОИС НИТУ МИСИС «Плазменная обработка термочувствительных нановолокнистых скаффолдов» под №02–457–2020 от 20.04.2020г.

Апробация работы. Основные результаты исследований докладывались на следующих российских и международных конференциях: «Биогибридные системы в химии, биотехнологии и медицине» (22-23 апреля 2024 г., Тула, РФ), Materials of the 5th Int'l Conference on Nanochemistry (ICN 2024) (19-21 April 2024, Xiamen, China), XXVI Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (с международным участием), (18-20 апреля, 2023 Нижний Новгород), British Council Researcher Links Workshop “Patient-tailored biomaterials for tissue regeneration, combating microbial contamination and drug delivery” (October 2-4, 2019, Lancaster, UK), International Conference on Advances in Tissue Engineering and Biomaterials Science, (June 6-9, 2019, London, UK), 61st Annual Technical Conference TechCon (May 5-10, 2018, Orlando, FL, USA), XIV Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов», (17-20 октября, 2017, Москва, РФ).

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, общих выводов, списка цитируемой литературы из 245 наименований и 7 приложений. Работа изложена на 151 страницах машинописного текста и содержит 50 рисунков, 24 таблицы.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Применение субмикронных волокон для биомедицинских приложений

Полимерные волокна нано- и субмикронного размера показывают высокий потенциал в разработке новых материалов для биомедицинских применений, включая регенерацию тканей, лечение ран, адресную доставку лекарств и создание передовых биосенсоров[5,6]. К основным преимуществам использования ультратонких полимерных волокон можно отнести следующие параметры:

- Нано-/субмикронные волокна имеют высокую пористость, что способствует высокой газопроницаемости и снижению сопротивлению воздушному потоку. Волокнистые мембраны служат физическим барьером, который способен механически изолировать от внешних микроорганизмов и загрязняющих веществ за счет структурированности пор в материале[7,8]. Высокая воздухопроницаемость обеспечивает клеточное дыхание, а также предотвращает высыхание и обезвоживание ран [9].
- Морфология волокон имитирует структуру аналогичную естественному внеклеточному матриксу, который может действовать как клеточный каркас во время процесса регенерации, создавая физическую поддержку для клеток и обеспечивая оптимальную микросреду для адгезии, размножения, миграции клеток, а также их дифференциации. Использование волоконных материалов при заживлении ран способно предотвращать формирование шрамов [10,11].
- Нано-/субмикронные волокна имеют большую удельную площадь поверхности, способны эффективно поглощать кровь и экссудат, обладают выраженными гемостатическими свойствами [12]. Кроме того, более высокая удельная площадь поверхности благоприятна для адсорбции как патогенов (для фильтрационных приложений)[13], так и загрузки активных ингредиентов, таких как антимикробные препараты, неорганические наночастицы, факторы роста и растительные экстракты (для регенеративной медицины)[14,15].
- Скорость и время высвобождения терапевтических агентов можно контролировать путем регулировки структуры волокна и морфологических размеров для содействия эффективному заживлению ран[14].
- Волокна могут быть получены из широкого спектра полимеров, в том числе и из биоразлагаемых, что позволяет как снизить экологическую нагрузку, вызванную необходимостью утилизации использованных фильтрационных изделий, так и

предотвращает необходимость замены и, соответственно, механических повреждений при использовании в приложениях регенеративной медицины.

Существуют различные методы получения волокон с нано- и субмикронным диаметром: межфазная полимеризация[16], механическое растяжение[17], сублимационная сушка[18], шаблонный синтез[19], самосборка[20], центрифугирование[21]. Электроформование привлекло повышенное внимание среди этих методов из-за его эффективности, низкой стоимости производства, легкой адаптивности, масштабируемости, контролируемости и простоты [22,23]. В Таблице 1 обобщены влияния параметров процесса на морфологию получаемых материалов.

Таблица 1 – Влияние параметров процесса электроформования на морфологию сформированных волокон [9,24]

Параметр	Эффект на морфологию волокон
Параметры раствора	
↑ Молекулярный вес полимера	↓ Образование шариков /капель; ↓ Формирование волокон неправильной формы с крупными порами;
↑ Концентрация полимера (вязкость)	↓ Формирование шариков; ↑ Диаметр волокна (в оптимальном диапазоне);
↑ Проводимость раствора	↓ Равномерные волокна без шариков ↓ Диапазон распределения диаметра волокон
↑ Летучесть растворителя	Образование пор на поверхности волокна (микротекстура)
Параметры процесса	
↑ Приложенное напряжение	↓ Образование шариков /капель; ↓ Диаметр волокна
↑ Расстояние между наконечником и коллектором (рабочее расстояние)	↓ Диаметр волокна Формирование капель/шариков происходит на слишком коротком или слишком далеком расстоянии Для равномерного формирования волокон требуется минимальное расстояние
↓ Скорость подачи	↓ Диаметр волокна
Параметры среды	
↑ Температура	↓ Диаметр волокон
↑ Влажность	Образование пор в волокнах
↑ Воздушный поток	↑ Диаметр волокна

Таким образом, электроформованные волокна демонстрируют значительный потенциал в производстве материалов для широкого спектра биомедицинских приложений. Регулировка процесса и состава формообразующего полимера позволяет получать материалы с желаемыми характеристиками.

1.1.1 Фильтрационные приложения нано- и субмикронных волокон

На настоящий момент фильтрация остается главной сферой применения нетканых материалов, полученных методом электроформования, поскольку субмикронные волокна способны обеспечить защиту от наночастиц аэрозолей, химических веществ (таких как нервно-паралитические вещества, горчичный газ) и биологических угроз, включая бактериальные и грибные споры, вирусы и т. д. [25–27] Ранее была показана возможность субмикронных волокнистых фильтров эффективно фильтровать частицы размером более 10 нм, что делает их подходящими для широкого спектра применений фильтрации [28]. Существует пять основных механизмов фильтрации с использованием нановолокнистых фильтрующих материалов (Рисунок 1а): механизм инерционного удара для крупных частиц (обычно больше 1 мкм), механизм перехвата для частиц среднего размера (обычно от 0.1 до 1 мкм), механизм диффузии для мелких частиц (меньше 0.1 мкм), электростатическое притяжение (для заряженных частиц), гравитационное притяжение (для крупных и тяжелых частиц). На практике все механизмы работают одновременно, и их относительный вклад зависит от характеристик частиц (размер, плотность, заряд) и условий потока (скорость, вязкость). Например, для частиц среднего размера (0,1–1 мкм) доминирующими механизмами являются перехват и диффузия, тогда как для более крупных частиц важнее инерционный удар [28,29]. Для тестирования фильтрационной способности принятым стандартом является анализ пропускания частиц размером 300 нм (most penetrated particle size, MPPS), так как данные частицы представляют наибольшую угрозу при попадании в организм, а эффективность их фильтрации обусловлена комбинацией перечисленных механизмов (Рисунок 1б) [30–32].

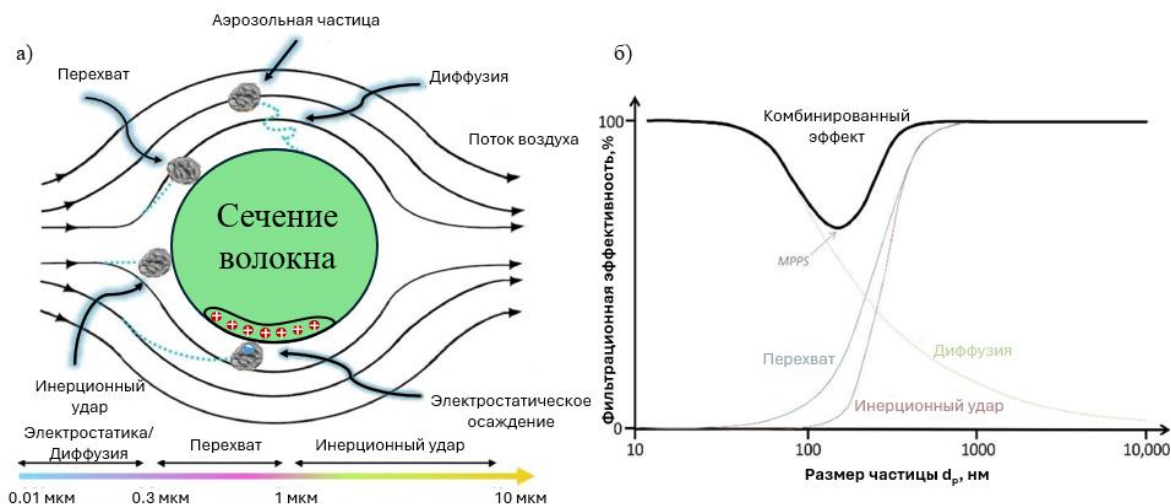


Рисунок 1 – Схематическое изображение основных механизмов захвата волокон. (а)Ниже приведена упрощенная диаграмма, показывающая диапазон размеров частиц, в котором более эффективны электростатический, диффузия, перехват и инерционный ударный механизм более эффективны; пример электростатического осаждения представлен на схематическом изображении электростатического притяжения, возникающего между волокном с положительным зарядом (красный знак, плюс) и отрицательно заряженной аэрозольной частицей (синий знак, минус). (б) Графическое представление основных кривых эффективности фильтрации для одного волокна в зависимости от размера частиц

Твердые частицы (particulate matter, PM) представляют выраженную и постоянную опасность для здоровья человека, поскольку PM часто представляют собой смесь различных твердых веществ и жидкостей с различным химическим составом в зависимости от области их образования [33–35]. Отходы сельскохозяйственных культур, выбросы транспортных средств и промышленные выбросы (в составе которых есть: NO_x , SO_x , ароматические углеводороды, металлы) являются составляющими PM. PM в основном делятся на категории в зависимости от их размера — PM₁₀ (≤ 10 мкм), PM_{2,5} ($\leq 2,5$ мкм) и $\leq$ PM_{1,0} (1 мкм), PM_{0,3} ($\approx 0,3$ мкм) и PM_{0.1} [34,36]. PM₁₀, имеющие аэродинамический диаметр 2,5-10 мкм, в основном оседают в трахее. PM_{2.5} диаметром менее 2,5 мкм представляют большую проблему, поскольку могут проникать глубоко в терминальные бронхиолы и альвеолы, а некоторые из них с диаметром $<0,1$ мкм могут даже попасть в кровотоки, поражая другие органы (Рисунок 2). Стоит также отметить, что диапазон размера вирусов, представляющих высокую биологическую угрозу, колеблется в диапазоне 20-300 нм[37].

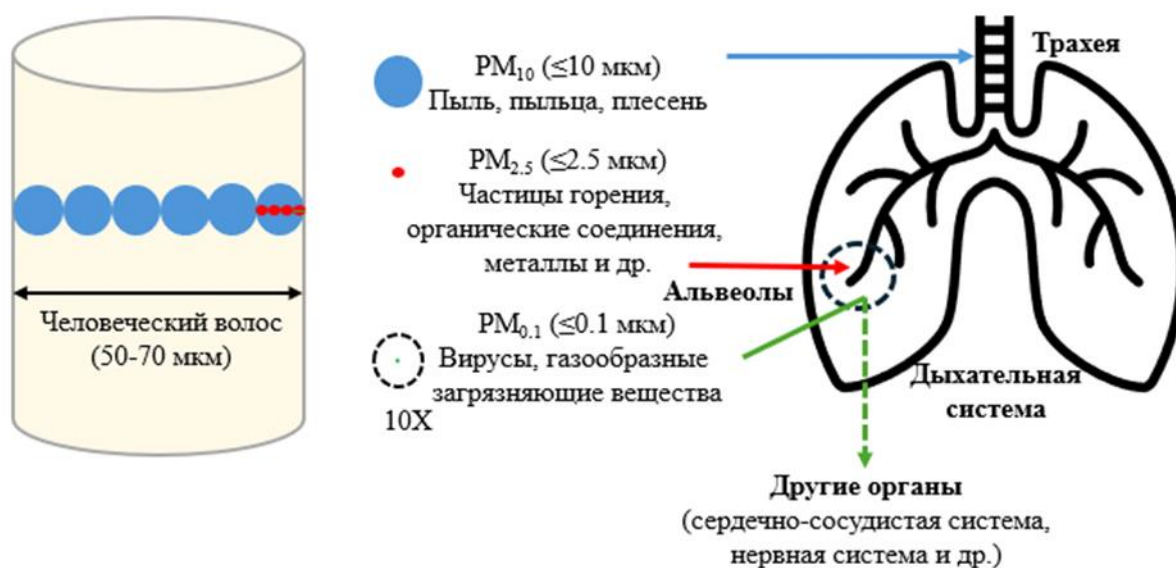


Рисунок 2 – Размер, основной состав и место осаждения в легких твердых частиц (РМ). Средний диаметр человеческого волоса составляет 60 мкм, что примерно эквивалентно шести вдыхаемым частицам РМ₁₀ (<10 мкм в диаметре, синий цвет), или двадцати четырем мелким частицам РМ_{2.5} (<2.5 мкм в диаметре, красный цвет), или шестистам ультратонким твердым частицам РМ_{0.1} (диаметр <0.1 мкм, зеленый цвет). 10X: материал в пунктирном кольце увеличен в десять раз

Если с фильтрацией крупных частиц (РМ₁₀) хорошо справляются традиционные воздушные фильтры, то фильтрация субмикронных/наноразмерных частиц требует улучшения технологии. Уменьшение диаметра волокна, а также межволоконного пространства между волокнами приводит к значительному улучшению механической адсорбции мелких частиц в получаемых мембранах [38–40]. Дополнительным преимуществом фильтрующего слоя из нано- и субмикронных волокон является низкое аэродинамическое сопротивление, что обеспечивает минимальное сопротивление потоку воздуха, делая материал энергоэффективным и обеспечивая комфортную воздухопроницаемость. [41]

Skaria и соавт. [26] сравнивали эффективность фильтрации и воздухопроницаемость фильтрующей маски на основе субмикронных волокон (Ultra™ Sensitive Earloop Mask, Secure Fit™ Mask Technology, США) и респиратора N95 с использованием радиоактивно-меченных капель аэрозоля (со средним диаметром 0.95 мкм) и манекена, имитирующего дыхание (15 вдохов/мин, V=500 мл, рабочий цикл 0.5 сек). Было показано, что маска на основе электроформованных волокон значительно снизила сопротивление воздушному потоку (0.08 против 0.27 см H₂O), что привело к большей совместимости лицевой маски и повышению эффективности фильтрации, которая достигается при использовании респиратора N95 (98.9% против 83.8%). Wang и др. [42] провели исследование, используя

четыре тестовых фильтра, каждый из которых состоял из слоя ультратонких волокон, нанесенных на подложку из микроволокон. Во всех тестируемых материалах волокна имели диаметр 150 нм, но эффективная плотность упаковки была различной и находилась в диапазоне 0,034–0,134. Режим тестирования (скорость потока 0,10 м/сек., диаметр аэрозольных частиц 3–780 нм) для всех материалов был одинаковый. Было показано, что как эффективность фильтрации, так и падение давления увеличивались с увеличением плотности упаковки слоя субмикронных волокон. Результаты моделирования хорошо согласовались с экспериментальными данными для частиц размером более 20 нм.

Leung и др. [41] получали ультратонкие волокна из полиэтиленоксида (ПЭО) с диаметром 208 нм, нанесенными на микроволоконную подложку (диаметр 14,7 мкм, плотность упаковки 0,13, незначительная эффективность фильтрации и перепад давления), чтобы изучить влияние скорости потока, толщины фильтра и плотности упаковки на эффективность фильтрации (аэрозольные частицы 50–480 нм) и падение давления. Было протестировано четыре фильтра из субмикронных волокон, с толщиной слоя от 11,4 до 17,2 мкм и плотностью упаковки от 0,0039 до 0,036 на двух скоростях потока (0,05 и 0,1 м/сек.). Результаты показали, что размер проникающих частиц уменьшался с увеличением плотности упаковки, а эффективность фильтрации в целом снижалась с увеличением скорости потока. Толщина фильтра, похоже, оказывала менее заметное влияние на задержку частиц, чем плотность упаковки.

В работе [43] было изучено влияние нанесения электроформованных волокон из полиакрилонитрила (ПАН) и ПАН-Си (с добавлением в раствор полимера соли меди) на семь распространенных типов субстратов, используемых в респираторах (два типа ткани, полученной методом мелтблаун, плотностью 15 и 25 г/м², два типа ткани спанбонд плотностью 25 и 30 г/м², ткань SSMMS плотностью 25 г/м², ткань с активированным углем и ткань Tetron) на эффективность фильтрации. Было показано, что добавление соли меди в состав формообразующего полимера привело к получению волокон с меньшим диаметром за счет повышения электропроводности: 332 ± 41 против 227 ± 16 нм для ПАН и ПАН-Си, соответственно. Эффективность фильтрации (для аэрозольных частиц размером 300 нм) всех тестируемых исходных материалов после нанесения волокон существенно повысилась: начальные значения фильтрации находились в диапазоне 20–40%, после нанесения слоя волокон на все типы материалы эффективность фильтрации была определена на уровне > 90%. При этом волокна с меньшим диаметром (ПАН-Си) показали более высокие фильтрующие характеристики (на ~5% выше, чем чистые ПАН).

В работе [44] было изучено влияние добавления растворимых солей металлов (2 мас.‰: серебра, меди, цинка) на диаметр и распределение получаемых ПВДФ волокон (Рисунок 3), а также проведена оценка эффективности фильтрации частиц PM3, PM0.3, PM0.1 в зависимости от состава и толщины фильтрующего слоя (Таблица 2). Было показано, что хотя добавление солей не изменило средний диаметр получаемых в процессе электроформования волокон, зато существенно улучшило распределение, фактически исключив формирование микронных волокон (в случае солей меди и цинка).

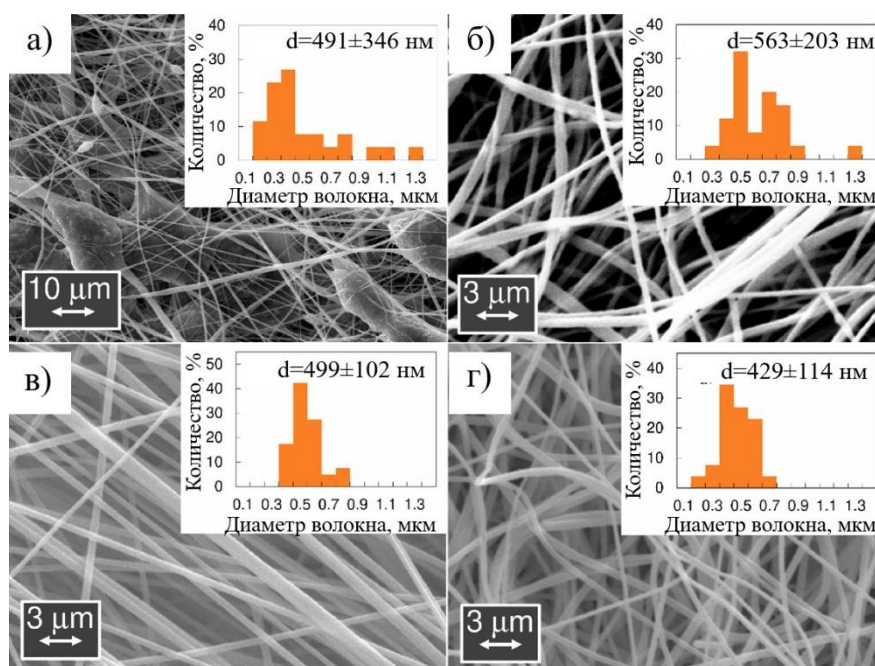


Рисунок 3 – Микрофотографии СЭМ и графики распределения диаметра волокон (вставки) электроформованных фильтрующих материалов, изготовленных с использованием раствора (а) 28 мас.‰ ПВДФ с добавлением (б) 2 мас.‰ AgNO_3 или (в) 2 мас.‰ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ или (г) 2 мас.‰ ZnCl_2 [44]

Толщина слоя фильтрующего материала также влияла на эффективность фильтрации: было показано, что при тестировании материалов без металлов слои толщиной 130 мкм демонстрируют значения выше для фильтрации частиц PM3, PM0.3, PM0.1 в сравнение с более тонкими слоями. Все материалы с добавленными в раствор солями показывают высокие значения эффективности фильтрации всех типов частиц вне зависимости от толщины получаемого слоя (Таблица 2).

Таблица 2 – Эффективность фильтрации частиц (E) и перепад давления ПВДФ волокон с добавлением 2 мас.‰ AgNO_3 или $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ или ZnCl_2 [44]

Состав	Толщина фильтра (мкм)	E , 100 нм (%)	E , 300 нм (%)	E , 3000 нм (%)
28% масс. ПВДФ + ДМА	55 ± 5	$65,34 \pm 1,16$	$75,92 \pm 0,03$	$99,48 \pm 0,09$
	85 ± 5	$83,95 \pm 4,08$	$92,39 \pm 1,81$	$99,91 \pm 0,06$
	130 ± 8	$95,46 \pm 1,04$	$99,21 \pm 0,20$	$99,97 \pm 0,01$

Состав	Толщина фильтра (мкм)	E , 100 нм (%)	E , 300 нм (%)	E , 3000 нм (%)
28% масс. ПВДФ + ДМА + 2% масс. AgNO_3	100 ± 10	$100 \pm 0,00$	$99,3 \pm 0,18$	$99,9 \pm 0,04$
28% масс. ПВДФ + ДМА + 2% масс. $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$	35 ± 4	$98,53 \pm 0,51$	$99,67 \pm 0,17$	$100 \pm 0,24$
	90 ± 8	$100 \pm 0,00$	$100 \pm 0,01$	$100 \pm 0,00$
	145 ± 10	$99,88 \pm 0,13$	$99,99 \pm 0,01$	$99,96 \pm 0,09$
28% масс. ПВДФ + ДМА + 2% масс. ZnCl_2	30 ± 5	$98,93 \pm 0,12$	$99,04 \pm 0,14$	$99,88 \pm 0,10$

Структура субмикронных волокон может быть получена из широкого спектра полимеров, что определяется как сферой их применения, так и желаемыми характеристиками. После пандемии COVID-19, коммерчески доступные маски для защиты органов дыхания на основе нано- и субмикронных волокон становятся все более популярными в медицине, промышленности и для повседневного использования в условиях загрязненного воздуха. В частности, можно отметить следующих производителей: Nanomask O2 (Viaex Technologies, США), Air Queen BLACK Nanofiber Mask (Air Queen™, Корея), Totobobo NanoTech Mask (Totobobo, Сингапур), VK Nanofiber Respirator (Respilon, Чехия), NASK Nanofiber Respirator (NASK TCL, Гонконг), Inofilter® (Inovenso, Турция/США). Фильтрующий слой в данных масках получают из синтетических и термопластичных полимеров, таких как полиакрилонитрил (ПАН), поливинилиденфторид (ПВДФ), полипропилен (ПП), полибензимидазол (ПБИ), нейлон, полиуретан (ПУ), полиимид (ПИ) и полистирол (ПС)[22–24]. Как и широко используемые хирургические маски, изготовленные из ПП, перечисленные полимеры являются неразлагаемыми, что приводит к утилизации миллиардов масок, выбрасываемых каждый год, обуславливая серьезные неблагоприятные последствия для окружающей среды [45–47]. Временно решить эти проблемы можно, увеличив время ношения масок. В частности, многие производители масок на основе нано- и субмикронных волокон предлагают проводить стерилизацию масок после определенного срока носки (как правило в течение 1 недели) за счет ручной/машинной стирки или обработки спиртом. Тем не менее, срок безопасного использования маски трудно оценить, поскольку время сохранения эффективности фильтрации напрямую зависит от степени загрязненности воздуха и скорости миграции

адсорбированных патогенов в фильтрующем слое. При пролонгированном сроке использования эффективность фильтрации падает и риск вторичной контаминации становится высоким. В итоге, экологическая проблема может быть полностью решена только при использовании фильтров из биоразлагаемых полимеров. Кроме того, для минимизации риска биологической угрозы (заражения бактериями, спорами грибов, вирусами) важно придать материалу самоочищающиеся (антибактериальные/противовирусные/фунгицидные) свойства.

Поэтому использование биоразлагаемых синтетических и природных полимеров в масках вызывает значительный интерес как средство снижения загрязнения окружающей среды [48,49]. Одним из наиболее широко изученных биоразлагаемых полимеров для этих целей является поли(ϵ -капролактон) (ПКЛ), который обладает такими преимуществами, как отличная механическая прочность, хорошая биосовместимость, медленная скорость деградации и образование нетоксичных остатков при гидролитической деградации [50]. Разрушение ПКЛ происходит путем гидролиза сложноэфирных связей с образованием кислотных мономеров [51]. В Таблице 3 обобщены несколько работ по созданию антибактериальных/противовирусных мембран на основе волокон ПКЛ.

Таблица 3 – Использование волокон на основе ПКЛ для создания самоочищающихся мембран

Состав, диаметр	Терапевтический агент	Антипатогенная активность	Противовирусная активность	Ссылки
ПКЛ 200 ± 10 нм	ZnO НЧ НТ галлуазита	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	-	[52]
ПКЛ+ПЭО 116.6±26.8 нм	Ag НЧ	<i>E. coli</i>	-	[53]
ПКЛ+ПЭО 160±100 нм	CuO НЧ	-	Коронавирус Sars-CoV-2	[54]
ПКЛ/зеин <400 нм	Ag НЧ	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> фаг	[55]
ПКЛ/ХЗ 362±95 нм	Фосфоний хитозан	-	Коронавирус MHV-3	[56]
ПКЛ (622±106 мкм) +ПВС (242±92 нм)	золедроновая кислота Ag НЧ	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	-	[57]
ПКЛ ~2мкм	Ag НЧ или MgO или TiO ₂	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	-	[58]
ПКЛ 265 нм	Ag НЧ или Ag-Fe	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	-	[59]

Состав, диаметр	Терапевтический агент	Антипатогенная активность	Противовирусная активность	Ссылки
ПКЛ 3-4 мкм	Нанотрубки галлуазита Эритромицин	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	-	[60]
ПКЛ/желатин 133±26 нм	Куркумин	<i>MRSA</i> <i>ESBL</i>	-	[61]
ПКЛ 0.5-4 мкм	ZnO	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	-	[62]
ПКЛ 190±53 нм	Берберин	<i>S. aureus</i> , <i>MRSA</i> , <i>E. coli</i> <i>C.albicans</i>	-	[63]
ПКЛ/ПВС 0.65±0.25 мкм	Соль меди (Cu^{2+})		Коронавирус MHV-3	[64]

1.1.2 Нано- и субмикронные волокна для костной регенерации

Формирование костной и хрящевой ткани путем трансплантации аутогенной ткани становится перспективной технологией в биомедицинской инженерии, поскольку количество пациентов с проблемными или поврежденными суставами и эрозией костей растет с каждым годом [65,66]. Инженерия костной ткани, основанная на применении «умных» биоматериалов, может помочь избежать проблем, связанных с нехваткой донорских материалов, иммунного отторжения и переноса патогенов.

При разработке биоматериалов для терапии костных повреждений необходимо понимать как состав кости, так и процессы восстановления при повреждении. Кость — это сложная биологическая ткань, которая состоит из уникального внеклеточного матрикса и нескольких типов костных клеток в нем (остеобласты, остеокласты и остеоциты). Костный матрикс состоит из органической фазы (35%: коллаген (Кол), протеогликаны, неколлагеновые белки) и минеральной фазы (65%: в основном нестехиометрический гидроксиапатит (ГАП) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_x(\text{OH})_y$, который часто содержит примеси, такие как карбонат (CO_3^{2-})). При восстановлении костной ткани (Рисунок 4) важно, как минимизировать стадию воспаления за счет включения антимикробных агентов, стимулировать адгезию и пролиферацию клеток, участвующих в восстановлении повреждения, а также обеспечить дополнительный источник ионов Са, для обеспечения более высокой скорости минерализации [67,68].

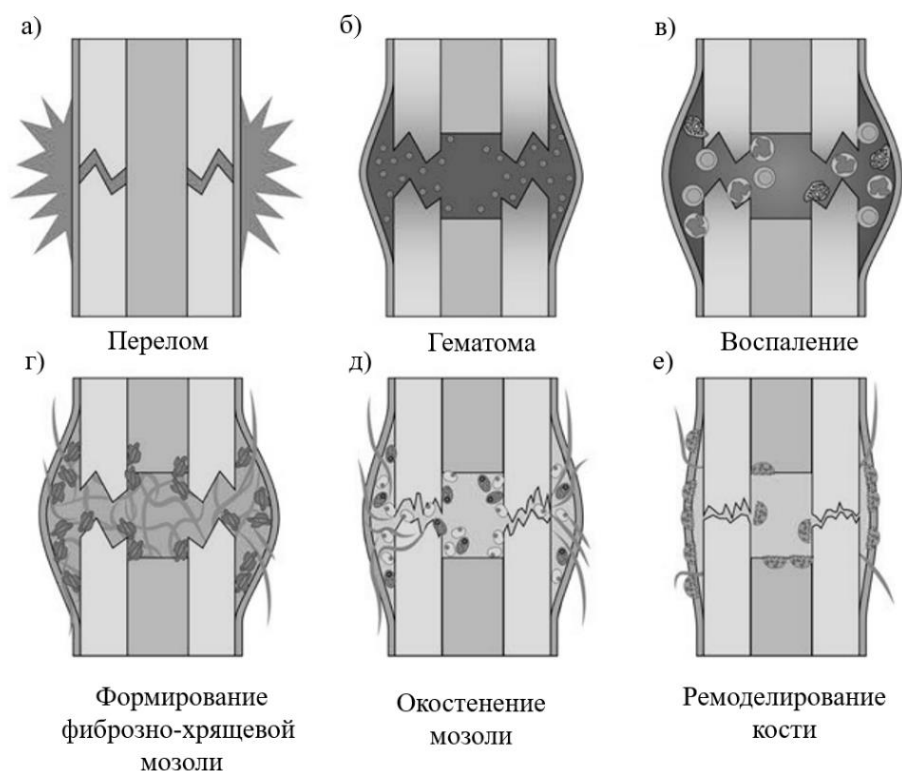


Рисунок 4 – Стадии заживления перелома: при травме происходит разрушение надкостницы и кости(а), формирование сгустка крови, обеспечивающий временный матрикс (б), воспалительная фаза, вызванная патогенами и хемокинами, высвобождающимися при дегрануляции тромбоцитов (в), расширения и миграции мезенхимальных клеток (г), формирование костной ткани (д), процесс ремоделирования восстанавливает форму и структуру кости(е)[68]

Потенциальный синтетический материал, подходящий для замены поврежденной кости, должен обладать сочетанием биологических и механических свойств: биоактивностью, биodeградируемостью и достаточной механической прочностью[65], что, однако, трудно достичь в одном материале. Именно поэтому более сложные композитные наноструктурированные материалы волокнистой морфологии, схожей с морфологией внеклеточного матрикса, широко используются для создания скаффолдов (каркасов), которые поддерживают структуру костей и способствуют их регенерации [66–69]. Это особенно важно при лечении переломов, дефектов костей или остеопороза [70,71]. Также биоматериалы, стимулирующие восстановление костной ткани, используются в стоматологии для сохранения альвеолярного отростка, возникающего при удалении зубов [72].

Для репликации структуры внеклеточного матрикса (ВКМ) и создания необходимой среды для роста и пролиферации клеток, диаметр волокон должен находиться в диапазоне 50–500 нм [69–71]. Использование нано-/субмикронных волокон способствует упорядочиванию клеток и формированию обширных межклеточных связей на

микроуровне, повышая таким образом качество формирующейся костной ткани [72,73]. Кроме того, в состав материала могут быть добавлены факторы роста [74,75], пептиды [76–78], стволовые клетки [74,79] для повышения адгезии, миграции и пролиферации клеток.

Для стимуляции остеоинтеграции, в состав волокон часто вводят Са-содержащие наночастицы. Существуют несколько широко-применяемых подходов для получения композитных Са-содержащих электроформованных волокон: 1) добавление наночастиц на основе Са (трикальцийфосфат (ТКФ), гидроксиапатит (ГАП), тетракальцийфосфат (ТРКФ)) в состав формообразующего полимера [80,81]; 2) выдержка материала в среде, моделирующей внутреннюю среду организма (simulated body fluid, SBF) [82,83]; 3) выдержка в альтернативном растворе (Ca^{2+} , PO_4^{3-}) [84–86]. Однако, стоит отметить, что большинство синтезированных нано- и субмикронных скаффолдов имеют инертную поверхность, которая не приводит к биоминерализации при инкубации в SBF. Поэтому много исследований посвящено способам модификации поверхности скаффолдов. В частности, было показано, что высокореакционные карбонильные ($-\text{CO}-$), карбоксильные ($-\text{COOH}$) и гидроксильные ($-\text{OH}$) группы [87–89], а также группы Ti-OH [90,91] усиливают образование Са-содержащих частиц на поверхности волокон при выдержке в растворе, имитирующей внутреннюю среду организма. Для повышения скорости биоминерализации часто применяют более концентрированные среды минерализующих растворов [92].

При разработке скаффолдов для регенерации костной ткани, предпочтение отдается биоразлагаемым полимерам, так как это исключает необходимость повторного вмешательства для извлечения материала. Полимер ПКЛ может разлагаться путем гидролиза его сложноэфирных связей в физиологических условиях и обладает высокой механической прочностью по сравнению с большинством синтетических полимеров [2]. Его относительно медленная скорость деградации дает время для ремоделирования костной ткани, что привело к его растущему использованию в костной инженерии [93–95]. Однако чистый ПКЛ не обладает остеогенным потенциалом и не способен эффективно вызывать регенерацию костной ткани [96]. В связи с этим последние исследования были направлены на комбинирование ПКЛ с различными материалами или на разработку способов модификации поверхности для улучшения его свойств.

Venugopal и др. изготовили биокompозитные волоконные скаффолды (ПКЛ/коллаген (Кол)/ГАП диаметр волокон 373 ± 191 нм) для обеспечения механической поддержки и засеяли их остеобластами человека (hFOB). Было показано, что полученные материалы поддерживают адгезию, миграцию, пролиферацию и минерализацию hFOB, для формирования костной ткани для регенерации костных дефектов. При этом материал

демонстрирует хорошие механические свойства ($\sigma=1.73$ МПа) [97]. ПКЛ-скаффолд (диаметр волокон 0.1–5 мкм) засеивали крысиными мезенхиальными стволовыми клетками (МСК) и культивировали в течение 4 недель. После чего образцы были имплантированы в брюшную полость крысы на 4 недели. Результаты показали образование костной ткани в месте имплантации [98]. В работе [99] были получены электроформованные волокна ПКЛ/Кол с добавлением фактора роста соединительной ткани (CTGF) и наночастиц CaSiO_3 (0.44 ± 0.01 мкм). Было показано, что полученный материал способствует миграции, пролиферации и остеогенной дифференцировке МСК посредством регионального высвобождения CTGF и CaSiO_3 . Тесты *in vivo* демонстрировали ускоренное заживлению интерфейса сухожилия-кости в ткани вращательной манжеты крысы. В работе [100] были получены композитные волокна ПКЛ/ SrF_2 , поверхность которых была аминилизована с последующей иммобилизацией галловой кислоты. Было показано, что полученные материалы не оказывают цитотоксического действия на мезенхимальные стволовые клетки человека, при этом галловая кислота способствует образованию апатита на нановолокнах ПКЛ, а наночастицы SrF_2 в составе материала увеличивают количество отложенного апатита.

Стоит отметить, что структура субмикронных волокон сама по себе способна фильтровать попадание микроорганизмов в место повреждения (как это было рассмотрено в разделе 1.1.1), тем не менее включение терапевтических агентов способно помочь организму в борьбе с уже имеющимися инфекциями в месте повреждения. Для придания материалу антимикробных характеристик применяется широкий спектр терапевтических агентов, включая антибиотики, антибактериальные наночастицы, антимикробные полимеры и др. В Таблице 4 обобщены недавно опубликованные работы по созданию антибактериальных волоконных материалов на основе полимера ПКЛ для костной регенерации.

Таблица 4 – Антимикробные электроформованные субмикронные волокна ПКЛ для костной регенерации

Состав	Терапевтический агент	Результаты	Ссылки
Цинковая сетка (отверстия 1×2мм) с ПКЛ/ХЗ ($331,4 \pm 63,7$ нм)	Zn хитозан	Пористость: $94,6 \pm 0,8\%$ Механические свойства: $\varepsilon=16.1 \pm 0.9\%$, $\sigma=25.6 \pm 1.9$ МПа, $E=1.4 \pm 0.3$ ГПа Кумулятивный выход цинка Zn $0,23 \pm 0,09$ мкг/мл за 30 дней Ингибирование <i>S. Aureus</i> Биосовместимость MC3T3-E1 <i>In vivo</i> (дефект челюсти крысы)остеогенез	[101]

Состав	Терапевтический агент	Результаты	Ссылки
ПКЛ/Лигнин/ цеолитные имидазолатные каркасы	цеолитные имидазолатные каркасы (Zn^{2+} , ZIF-8)	Биосовместимость: rBMSCs Биоактивность: рост активности щелочной фосфатазы Ингибирование: <i>E. coli</i> и <i>S. aureus</i>	[102]
ПКЛ/ZnO Покрытие из полидофамина и пептида, имитирующего фактор роста эндотелия сосудов.	ZnO НЧ	Пористость: $55,13 \pm 7,74$ % Биосовместимость: BMSC Ингибирование: <i>E. coli</i> и <i>S. aureus</i> Стимуляция остеогенеза <i>In vitro</i> и <i>in vivo</i>	[103]
ПКЛ/ГА/ZnO	ZnO НЧ	Биосовместимость MC3T3-E1 Ингибирование <i>E. coli</i> и MRSA Усиление остеогенеза и хондрогенеза <i>in vitro</i>	[104]
ПКЛ/ГА/Ag	Ag НЧ	Биосовместимость: BMSC Материалы способствовали образованию апатита и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток <i>in vitro</i> Выход серебра: 7 мкг/мл 30 дней Ингибирование: <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i>	[105]
ПКЛ/Ta/ZnO	ZnO НЧ	Биосовместимость: BMSC Материалы способствовали остеогенной дифференцировке BMSC <i>in vitro</i> Выход цинка: 2.4 мкг/мл за 14 дней Ингибирование: <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> Мембраны из нановолокон ПКЛ/Ta/ZnO способствуют регенерации костей <i>in vivo</i> , а также способны подавлять воспаление при инфицировании и трансплантации <i>in vivo</i> .	[106]
ПКЛ-SrF ₂ - галловая кислота	SrF ₂	Биосовместимость: hMSCs Биоактивность: минерализация в SBF, повышение активности щелочной фосфатазы Ингибирование: биопленки <i>P. aeruginosa</i> Высвобождение: $Sr^{+2} 16.93 \pm 0.7$ мкг/мл	[100]

1.1.3 Нано- и субмикронные волокна для заживления ран

Заживление ран является сложным комплексным процессом, включающим в себя несколько стадий: гемостаз, воспаление, пролиферация и ремоделирование. Различные метаболические патологии, такие как сахарный диабет, ВИЧ, аутоиммунные заболевания, ожирение и болезни сердца, печени или почек, нарушают нормальные процессы репарации

тканей и могут приводить к образованию хронических незаживающих ран [107,108]. Хронические раны характеризуются продолжительным процессом восстановления (более 4 недель), вызванного длительным воспалением, постоянными инфекциями, образованием бактериальных биопленок, повышенным уровнем протеаз в крови и активных форм кислорода (АФК), а также изменением клеточной активности [109]. Особую клиническую сложность представляют патогены, обладающие множественной лекарственной устойчивостью, поскольку их лечение сопряжено с ограниченной эффективностью традиционных антибиотикотерапевтических подходов [110,111]. Разработка новых эффективных материалов для терапии хронических ран остаётся актуальной и важной задачей современной биомедицинской науки, решение которой позволит снизить экономическую нагрузку на систему здравоохранения и повысить качество жизни граждан. Согласно последним исследованиям, глобальная распространенность хронических ран оценивается в диапазоне 1,51–2,21 случаев на 1000 человек населения [112,113], а экономические последствия хронических ран существенны и составляют от миллионов до миллиардов долларов в год в зависимости от региона и страны (США: население – 340,1 млн. чел, расходы – 25 млрд. долларов в год; Сингапур: население – 5,918 млн. чел., расходы – 350 млн. долларов в год) [114].

Раневое ложе представляет собой удобную среду для прикрепления, колонизации и инфекции микроорганизмов, что приводит к инициированию сложного взаимодействия хозяина и микробиома. Моно- или полимикробные биопленки представляют собой сложные структуры, их очень трудно удалить механически или лечить фармацевтически, и они представляют собой основную причину развития хронических раневых инфекций. В острых ранах микробные инфекции (в основном бактериальные) можно легко вылечить местными антисептиками и/или антибиотиками. С другой стороны, в хронических ранах микроорганизмы имеют тенденцию развивать фенотипы толерантности и устойчивости к противомикробным препаратам и к механизмам иммунной защиты хозяина. Таким образом, предотвращение формирования биопленок за счет выраженного локального противомикробного действия является ключевой задачей при разработке перевязочных материалов. При этом материал не должен оказывать выраженного цитотоксического действия на здоровые клетки организма, а также стимулировать адгезию и пролиферацию клеток.

Полимерные нано- и субмикронные волокна представляют высокий потенциал в разработке высокоэффективных перевязочных материалов, поскольку обладают высокой воздухопроницаемостью, предотвращают попадание патогенов из внешней среды,

обладают гемостатическими свойствами, а их структура, имитирующая внеклеточный матрикс, способствует предотвращению формирования рубцовой ткани[10,115]. Введение терапевтических агентов для борьбы с патогенами, находящимися в месте повреждения, может быть осуществлено как за счет включения в состав формообразующего полимерного раствора, так и при иммобилизации их на поверхности. Получение электроформованных материалов из биоразлагаемых полимеров позволяет предотвратить риск механических повреждений, возникающих при замене перевязочного материала. Полимер поликапролактон (ПКЛ) успешно прошёл оценку биологической безопасности в соответствии с современными стандартами ISO 10993 как в *in vitro*, так и в *in vivo* моделях, что подтверждает его безопасность при контакте с тканями и биологическими жидкостями организма человека [116]. В Таблице 5 обобщены недавние работы по разработке антибактериальных перевязочных материалов на основе волокон ПКЛ.

Таблица 5 – Антибактериальные перевязочные материалы на основе волокон ПКЛ

Состав	Терапевтический агент	Результаты	Ссылка
ПКЛ волокна 100-500 нм	Антимикробный пептид пексиганан	Ингибирует: <i>E.coli</i> , <i>A. baumannii</i> Цитотоксичность: выживаемость 80% для чел. фибробластов	[117]
ПКЛ волокна 100-200 нм	сульфадиазин серебра	Ингибирует: <i>S. aureus</i> и <i>P. aeruginosa</i> <i>In vivo</i> : крысы Sprague-Dawley, не выявило рубцевания в области раны по сравнению с контрольной группой; ускорение заживления на 1 неделю	[118]
ПКЛ-ХЗ волокна Средний диаметр 99.84 нм	Хитозановые наночастицы, загруженные куркумином	Заживление <i>in vivo</i> MRSA инфицированных ран: 96,4% закрытие раны на 15 день применения. Гистологический анализ показал редкие воспалительные клетки в дерме, полную эпителизацию и наличие волокнистых соединительных тканей на 15 день применения.	[119]
ПКЛ/ПВС 395±137 нм	чайные полифенолы и ε-поли (L-лизин)	Ингибирует: <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> Цитотоксичность: выживаемость 90% мышинные фибробласты NIH/3T3 Антиоксидантная активность: повышение антиоксидантной активности в 8 раз в сравнение с материалом без активных добавок.	[120]
ПКЛ/ПВС 150-200 нм	Ag НЧ	Ингибирует: <i>S. aureus</i> и <i>E.coli</i>	[122]

Состав	Терапевтический агент	Результаты	Ссылка
ПКЛ-ХЗ 230±74 нм	Ципрофлоксацин	Ингибирует: <i>S. aureus</i> и <i>E.coli</i> Цитотоксичность: 90+% выживаемости человеческих фибробластов Не вызывает гемолиза Заживление <i>in vivo</i> : 80% закрытия раны на 10 день применения	[121]
ПКЛ/полиэтилен гликоль	Куркумин	Цитотоксичность: 80% жизнеспособности мышинных миоцитов (C2C12) Ингибирует: чрезмерную продукцию оксида азота (NO) в макрофагах мышы RAW264.7 и рост <i>S. aureus</i> . Заживление ран <i>in vivo</i> увеличение скорости закрытия раны (99%) на 10- й день по сравнению с использованием материала ПКЛ без куркумина (59%).	[123]
ПКЛ 200-600 нм	Ag НЧ Черный Р НЧ	Не вызывает гемолиз Цитотоксичность: стимулирует рост фибробластов (L929) и эпителиальных клеток (HUVEC) Ингибирует: <i>MRSA</i> и <i>E.coli</i> Заживление <i>in vivo</i> : полное закрытие раны на 15 день применения, контроль на уровне 80%	[124]
ПКЛ-желатин 594±194 нм	Ag@BaTiO ₃ НЧ	Ингибирует <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> и <i>S. aureus</i> Цитотоксичность: выживаемость фибробластов NIH-3T3 90+% Заживление <i>in vivo</i> полное заживление на 11 день, более низкий уровень инфильтрации воспалительных клеток, стимулирование ангиогенеза	[125]
ПКЛ-желатин 100-300 нм	CeO ₂ НЧ	Цитотоксичность: стимулирует пролиферацию фибробластов NIH- 3T3 Ингибирует: <i>S. aureus</i> и <i>P. aeruginosa</i> Заживление инфицированных ран <i>in vivo</i> полное заживление на 15 день	[126]

1.2 Поверхностная модификация нано- и субмикронных волокон для медицинских применений

Поверхностные свойства субмикронных волокон играют критически важную роль в их практическом применении. В то время как объёмные характеристики определяют общие механические, термические и физико-химические свойства материала, именно поверхностные свойства непосредственно влияют на взаимодействие с окружающей средой, другими материалами или биологическими объектами. Модификация поверхности нановолокон является важным методом улучшения их свойств и функциональности, делая их пригодными для различных применений, в том числе биомедицинских. На Рисунке 5 отображен рост количества публикаций по теме «поверхностная модификация нановолокон», что свидетельствует о растущем интересе научного сообщества к данной теме. Поверхностное модифицирование становится мощным инструментом для расширения функциональности получаемых материалов. Поверхность нано- и субмикронных волокнистых мембран часто модифицируется с помощью осаждения покрытий или введения функциональных групп [127].

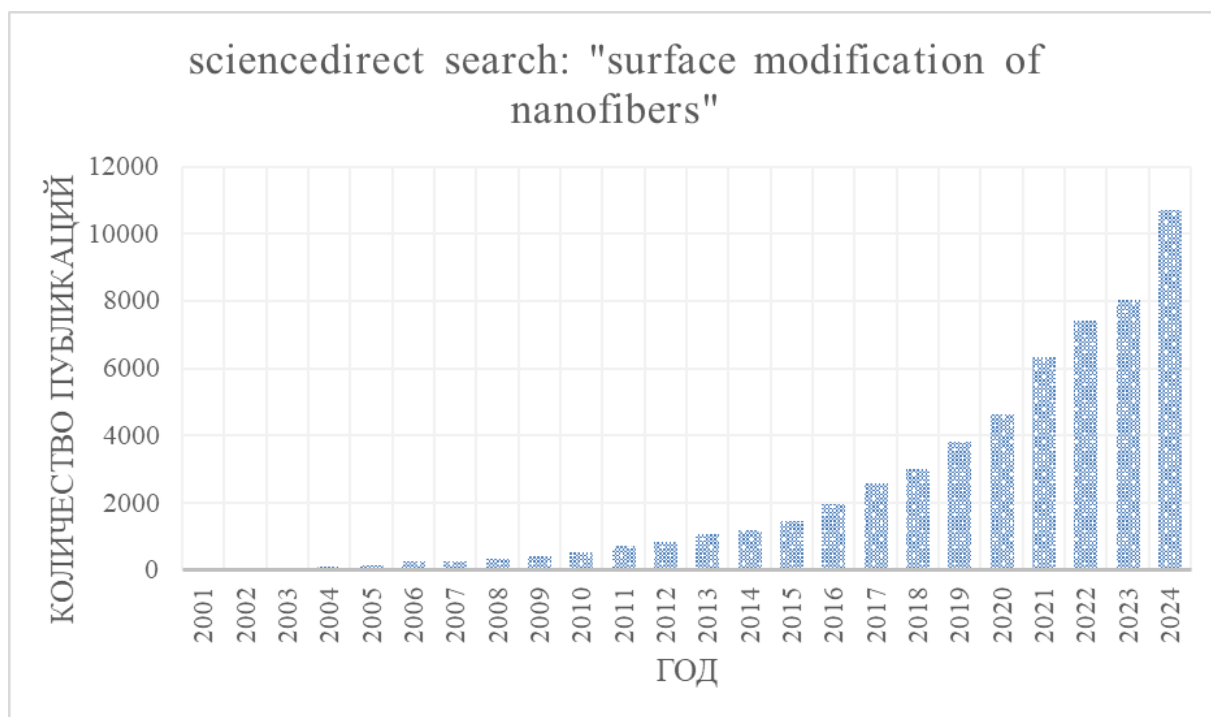


Рисунок 5 – Количество публикаций по поверхностной модификации нановолокнистых материалов по базе данных sciencedirect

Стоит также отметить, что при включение терапевтических агентов в полимерный раствор, из которого формируются нановолокна, есть риск их деградации при взаимодействии с растворителем [128], кроме того, требуются более высокие

концентрации препаратов, чем при иммобилизации их на поверхность, а скорость высвобождения напрямую зависит от скорости деградации полимера, в состав которого они включены [129]. В связи с перечисленными недостатками включения терапевтических агентов в состав формообразующего полимера иммобилизация препаратов на поверхности является более предпочтительным вариантом.

1.2.1 Модификация субмикронных волокон в низкотемпературной плазме (НТП)

Плазменная обработка является более экономичной и безопасной (отсутствие вредного растворителя, меньшая деградация образцов, отсутствие необходимости очистки от побочных продуктов), чем другие методы модификации полимерных материалов [127,130–132]. Метод плазменной обработки позволяет эффективно модифицировать изделия различного состава и геометрии, и может стать перспективной заменой химическим обработкам [133].

Поверхностная модификация полимерных материалов с применением низкотемпературной плазмы (НТП) является эффективным и универсальным методом изменения их поверхностных свойств. Основным преимуществом данного подхода является возможность значительного улучшения характеристик поверхности (например, поверхностной энергии, адгезии, гидрофильности, биосовместимости и т. д.) без существенного влияния на объёмные свойства материала. НТП представляет собой частично ионизированный газ, в котором температура электронов значительно превышает температуру тяжёлых частиц (ионов и нейтральных атомов), которые остаются приблизительно при комнатной температуре [134,135]. Для обработки полимерных материалов, зачастую имеющих низкую температуру плавления, наличие высокореакционных электронов в холодном газе является очень выгодным. В этих неравновесных условиях воздействие плазмы на поверхность приводит к быстрому образованию отрицательного электрического заряда на поверхности, чему способствует приход быстрых электронов, опережающих медленные ионы за счёт большей подвижности электронов. Отрицательный потенциал, образовавшийся на поверхности обрабатываемого материала, притягивает ионы из плазмы, повышая скорость их осаждения. Поскольку ионы часто являются «строительными» или «модифицирующими» частицами для поверхности, формирование этого плавающего потенциала повышает эффективность процесса модификации поверхности, сокращая время, необходимое для формирования поверхностных свойств, или позволяя протекать процессам, которые не произошли бы при аналогичных условиях в отсутствие плазмы [136].

Зажигание плазмы в большинстве используемых установок достигается за счёт приложения электрического поля к газу внутри специального реактора, что вызывает его ионизацию и образование активных частиц — ионов, свободных радикалов, возбуждённых молекул и атомов, при этом используются разряды, работающие как при пониженном давлении (постоянного тока, НЧ, 40 кГц, ВЧ, 13,56 МГц), так и разряды атмосферного давления (барьерный, коронный). В зависимости от механизма формирования и условий возникновения, в плазменной технологии выделяют несколько основных типов электрических разрядов [137,138], каждый из которых обладает уникальными физическими характеристиками и областью практического применения. Для обработки полимерных материалов наиболее часто применяется разряд переменного тока, который может быть реализован на различных частотах: от низкочастотного (НЧ) до сверхвысокочастотного (ВЧ) диапазонов, включая стандартные радиочастоты, такие как 40 кГц и 13,56 МГц. Такой разряд возбуждается внешним электромагнитным полем соответствующей частоты и позволяет получать устойчивую плазму с высокой степенью ионизации при пониженном давлении. Находит применение в современных плазменных технологиях, требующих высокой управляемости и контролируемости процесса.

Взаимодействие холодной плазмы с полимерными поверхностями представляет собой сложный физико-химический процесс, обусловленный совокупностью различных механизмов [139]. Следует подчеркнуть, что при воздействии НТП на материал все активные компоненты плазмы проявляют синергетический эффект. Схематическое представление воздействия НТП на полимер приведено на Рисунке 6. Воздействие плазмы происходит только на поверхности материала, в нано- и микрометрическом масштабе, не изменяя свойств объема.

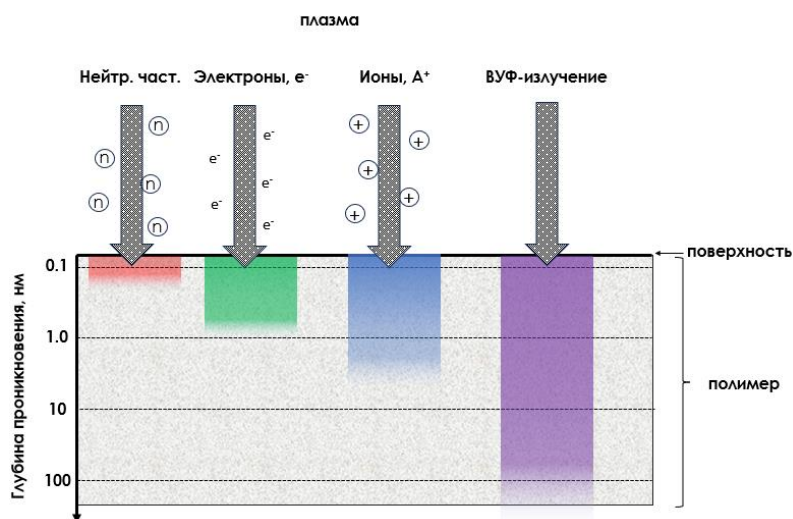


Рисунок 6 – схема воздействия компонентов НТП на поверхность полимера [140]

Происходящие изменения зависят от газа, используемого для генерации плазмы, и приводят к различным физическим и химическим свойствам [141,142]. Когда применяются реакционные газы, такие как кислород, фтор или аммиак, происходят химические изменения; в случае кислорода, например, на поверхности образуются новые пероксидные, гидропероксидные, карбоксильные или гидроксильные группы, что приводит к иммобилизации других интересующих соединений [143]. При плазменной обработке в атмосфере инертных газов, таких как гелий или аргон, обычно преобладают процессы сшивания [144]. В любом случае, применение плазмы включает в себя генерацию многочисленных высокореакционных компонентов, таких как ионы, радикалы, электроны, фотоны и другие возбужденные частицы [145], поэтому можно ожидать протекания альтернативных вторичных реакций.

Плазменное травление поверхности нано- и субмикронных волокон позволяет существенно повысить гидрофильность материала и улучшить адгезию клеток. Например, травление кислородом (60 с, тлеющий разряд, $P < 10$ мТорр) волокон из полимолочной кислоты ($d = 339 \pm 89$ нм) позволило существенно повысить гидрофильность материала ($128.2 \pm 2.3^\circ$ против $48.5 \pm 3.3^\circ$), при этом адгезия человеческих мезенхиальных клеток была в три раза выше в сравнении с немодифицированным контролем [146]. В работе [147] была проведена плазменная обработка ПКЛ волокон и изучено влияние типа газа (Ar, O₂, N₂) на угол смачивания и биоактивность полученных материалов. Было показано, что только кислородная плазменная обработка значительно снизила угол контакта с водой до $50,3^\circ$ градуса, в то время как другие газы уменьшили угол контакта до $96,3^\circ$ (N₂) или $100,8^\circ$ (Ar) градусов. Биологическая активность каждой плазменно-обработанной мембраны была дополнительно проанализирована путем оценки количества адсорбированного белка на их поверхности. Было показано, что обработка кислородной плазмой значительно увеличила адсорбцию белка бычьего сывороточного альбумина (БСА) 1,8 раза больше, чем на необработанных мембранах ПКЛ, при этом обработка Ar повысила сорбцию белка только в 1,4 раза, а обработка азотом не имела статистически значимой разницы в количестве адсорбированного белка. В работе [148] было показано, что плазменно-обработанные волокна ХЗ/ПВС в барьерном разряде (БР) повышают гидрофильность материала (ХЗ/ПВС: $77.23 \pm 0.57^\circ$; ХЗ/ПВС(Ar): 31.03 ± 0.39 ; ХЗ/ПВС(O₂): $23.10 \pm 0.18^\circ$) и выживаемость мышинных фибробластов L929. Однако, стоит отметить, что химия поверхности при плазменном травлении материалов напрямую зависит от химического состава обрабатываемого изделия, при этом повышение гидрофильности и улучшение взаимодействия с клетками носит лишь временный характер, восстановление исходных

свойств обычно происходит в течение 4 недель после обработки [149].

В связи с перечисленными недостатками, плазменная полимеризация [150] является более эффективным методом модификации, позволяющая осаждать тонкие стабильные полимерные плёнки с функциональными группами на материалы различного состава, включая титан/титановые сплавы, полимеры и керамику. Плотность и стабильность функциональных групп являются важными характеристиками плазменно-модифицированных биоматериалов, поскольку активные привитые функциональные группы повышают клеточную адгезию и могут быть использованы для иммобилизации различных биомолекул на плазменно-обработанные материалы [151,152]. Наиболее используемыми группами в плазменно-осажденных полимерах являются amino- ($-\text{NH}_2$) [153–160], карбоксильно-альдегидные ($-\text{COOH}/-\text{CHO}$) [161–164] и гидроксильные группы ($-\text{OH}$) [165–167]. COOH -группы могут вступать в реакции карбодиимидной химии для ковалентного связывания amino-содержащих биоактивных соединений, а также за счет выраженного отрицательного заряда способствуют минерализации. При этом отрицательный заряд поверхности открывает возможности по электростатической иммобилизации положительно-заряженных соединений или наночастиц (Cu/CuO , $\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{O}$, ZnO и др).

Плазменная обработка CO_2 и $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$, а также плазменное осаждение тонких пленок в газообразных смесях CO_2 с различными углеводородными газами (CH_4 , C_2H_4 и т.д.) уже несколько десятилетий используются для модификации химии поверхности полимеров путем введения COOH и других полярных групп для улучшения их гидрофильности [168–171]. Введение COOH -групп позволяет улучшить адгезию клеток [172] и иммобилизовать различные биомолекулы [173,174]. Однако, механизмы, скрытые за введением групп COOH и других углеродно-кислородных функциональных элементов изучены недостаточно хорошо.

CO_2 -плазменная обработка, которая вызвала большой интерес в прошлом, в настоящее время не используется, поскольку приводит к быстрой деградации поверхности. Кроме того, количество карбоксильных/сложноэфирных групп ($-\text{COOH}/-\text{COOR}$), введенных этим способом, было слишком низким [175–178]. Medard и соавт. безуспешно пытались увеличить плотность карбоксильных групп за счет добавления в газовую смесь паров воды [177]. Полученные результаты показали противоположный эффект: введение паров воды привело к уменьшению количества привитых карбоксильных/сложноэфирных групп за счет тушения реакционноспособных CO_2^* радикалов, которые являются инициаторами для введения на поверхность COOH

групп[179]. Было показано, что улучшение стабильности COOH-групп на поверхности плазменно-обработанных материалов может быть достигнуто за счет добавления этилена[180] в реакционную газовую смесь CO₂/Ar. Осаждение стабильных тонких пленок, содержащих группы COOH/C(O)OR (вклад C(O)O рассчитывался при анализе РФЭС спектров высокого разрешения C1s, варьировался от 5 до 15%) улучшило адгезию клеток к ПКЛ нановолокнам и позволяло иммобилизовать сосудистый эпидермальный фактор роста сосудов на поверхности, покрытых плазменно-осажденным полимером[173,181,182]. Высокий уровень сшивки достигался за счет введения этилена, который изменял характеристики плазмы и улучшал механическую стабильность осаждаемого покрытия, содержащего COOH-группы. Долговечность плазменно-осажденных полимерных слоев из смеси CO₂/C₂H₄ в несколько раз выше по сравнению с плазменной полимеризацией пленок акриловой кислоты [183]. Хотя Hegemann и соавт. показали, что состав плазменно-осажденного полимерного покрытия можно регулировать путем изменения соотношения CO₂/C₂H₄, необходимо более глубокое понимание плазменной полимеризации CO₂/C₂H₄. Высокая химическая стабильность (т.е. низкая потери толщины) плазменно-осажденных покрытий, полученных из смеси CO₂/C₂H₄ была достигнута только при очень низких соотношениях CO₂/C₂H₄, которые соответствуют низким концентрациям C(O)O. Стоит также отметить, что авторы не проводили дериватизацию групп COOH и анализировали различные концентрации углеродного окружения (C(O)O, C-O, CH_x и т.д.), измеренные с помощью РФЭС. Поскольку компонент C(O)O, расположенный при ~289 эВ, включает как карбоксильные группы и сложноэфирные группы, концентрация реакционноспособных COOH-групп не была определена.

Terlingen и др.[184] предположили, что активный атомарный кислород отвечает за прививку функциональных групп на поверхность полимерных субстратов (например, полиэтилена). Авторы обсудили упрощенный механизм прививки, но никакого четкого объяснения или экспериментальных доказательств, которые могли бы пролить свет на этот механизм, предложено не было. Medard и др. усовершенствовали модель, разработанную Terlingen, применив многочисленные методы оптической эмиссионной спектроскопии и масс-спектрометрии для получения ценной информации об активных видах в плазме CO₂ [171,177,179] и обнаружили несколько важных возбужденных молекул (CO*, O*) и ионов (CO⁺ и CO²⁺). Анализируя зависимость этих частиц от параметров плазмы и параметров газа, авторы смогли определить различные режимы CO₂ плазмы, а именно CO²⁻ и CO+O. При низкой мощности разряда основными активными видами,

представленными в плазме, были CO_2^+ и CO_2^* . При повышении мощности или увеличении времени обработки полимера (полиэтилена и полипропилена) наблюдалось снижение содержания CO_2^+ и CO_2^* . Аналогичный эффект для ПС, обработанного CO_2 -плазмой, был подтвержден Wang и др. [176,185].

На основании рассмотренных работ можно сделать вывод, что в зависимости от мощности CO_2 -плазмы и состава газовой смеси, различные плазменные радикалы играют значительную роль в функционализации поверхности. Кроме того, наличие полимерной подложки в реакторе снижает интенсивность эмиссионных линий важных активных видов на 20% за счет изменения химического состава плазмы (в основном за счет введения водорода и воды). Авторы подробно описали кинетику процессов, происходящих в плазме, и пришли к выводу о важности ионов и возбужденных частиц, таких как CO_2^* в функционализации поверхности. Они предложили очень интересный механизм, инициирующий прививку групп COOH через элиминирование водорода с последующей рекомбинацией радикала $^*\text{O}-\text{C}=\text{O}$ из газовой фазы с радикалом $^*\text{CH}$ в полимерной цепи [179].

Затем поглощение водорода приводит к образованию COOH -групп. Интересно, что авторы предположили, что CO_2^* присоединяется к полимерной цепи через атом углерода, что позволяет образовывать группы COOH , а не через атом кислорода, что приводит к образованию сложноэфирной группы [179]. Возможность прививки COOH через рекомбинацию COOH^+ ионов, образующихся в газовой фазе, также рассматривалась, но масс-спектроскопическое исследование CO_2 и $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ плазмы не выявило ионов COOH^+ в разряде [177]. Таким образом был сделан вывод, что основным механизмом включения функций COOC и COOH является взаимодействие возбужденного CO_2^* со свободными радикалами на поверхности полимера. Стоит отметить, что при добавлении в состав газовой смеси этилена плазмохимия $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4/\text{Ar}$ будет более сложная по сравнению с плазмой CO_2 .

1.2.2 Магнетронное распыление мишени на поверхность нано- и субмикронных волокон

Разработка современных наноструктурированных тонких плёнок, полученных методом магнетронного распыления, способствовала значительному прогрессу в области биоматериаловедения. Этот физический метод осаждения из паровой фазы основан на выбивании атомов из твёрдой мишени заданного состава с последующим их осаждением на подложку, что позволяет формировать тонкие плёнки с уникальными

эксплуатационными свойствами и функциональными характеристиками, недостижимыми при использовании традиционных методов нанесения покрытий[186]. Подбор состава мишени и атмосферы в камере позволяет регулировать химический состав получаемого покрытия и получать биоактивные покрытия на поверхности материалов для стимулирования взаимодействия между поверхностью материала и окружающими тканями [187,188]. На Рисунке 7 представлена общая схема технологии магнетронного распыления. В качестве распыляющего газа обычно используется аргон (Ar), однако в ряде случаев могут быть использованы и другие газы, например азот, кислород, и газовые смеси. Осаждаемые фрагменты распыляемой мишени накапливаются на подложке путем регулировки расстояния между мишенью и подложкой. Скорость осаждения пленки зависит от мощности разряда на мишени-катоде, дистанции, а также состава и давления газовой смеси. Количество атомов, распыляемых с поверхности на один падающий ион, известно как коэффициент распыления, «S». Значение S зависит от многих параметров, включая состав материала мишени, экспериментальную геометрию, энергию связи и свойства падающих ионов.

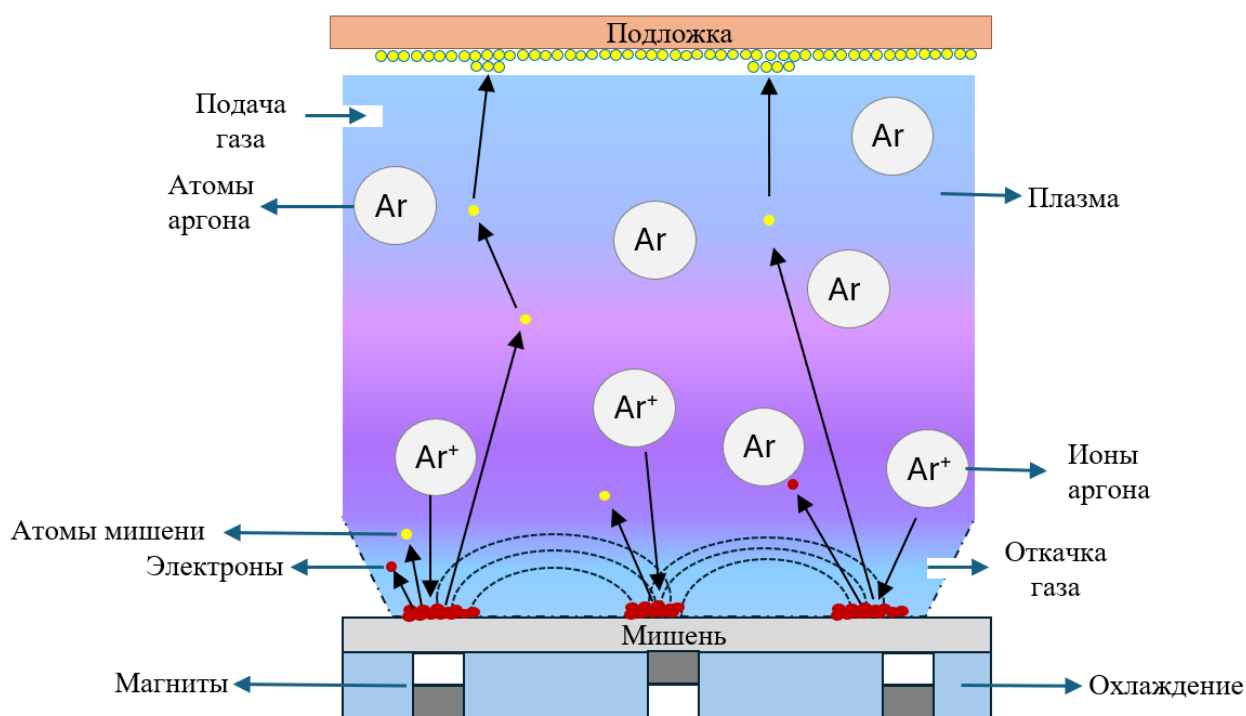


Рисунок 7 – Схематическое изображение технологии магнетронного распыления мишени

В основном данная технология широко применяется для поверхностной обработки имплантируемых сплавов и полимерных материалов с целью улучшения их характеристик, таких как антибактериальные свойства, биосовместимость/биоактивность, механических свойства и повышение остеоинтеграции. Наиболее широко применяемыми мишенями,

используемыми для получения биоактивных покрытий на поверхности полимерных и металлических имплантатов, являются TiC [189–191], TiN [192], TiO₂ [193], ZrN [194,195], ZrO₂ [196,197] и др. Опубликовано ограниченное количество работ по получению биоактивных покрытий на поверхности температурно-чувствительных полимерных волокон в связи со сложностью оптимизации режима обработки для сохранения их морфологических и объемных характеристик. Процесс обработки является быстрым и требует тщательного подбора времени обработки, рабочего расстояния и силы тока для обеспечения низкой температуры при модификации, при этом получаемые покрытия характеризуются высокой скоростью формирования пленки и прочной адгезией к поверхности [204].

В работе [205] на поверхность ПКЛ волокон осаждали титан в атмосфере аргона в течение 1, 3, 6 и 9 мин (Р 0.8 Па, U 200 В, I 0.2 А). Для предотвращения перегрева материала после каждой минуты работы магнетрона проводилась остановка процесса в течение 3 мин с последующим повторением цикла. На всех режимах морфология обрабатываемых материалов сохранялась, но при увеличении времени обработки шероховатость материалов увеличивалась. С увеличением циклов обработки было показано, что растет концентрация титана на поверхности (до 1.9 ± 0.4 ат.%), при этом происходит уменьшение угла смачивания (с $128 \pm 3^\circ$ до $87 \pm 3^\circ$). При оценке влияния обработки на адгезию и жизнеспособность клеток (эндотелиальные клетки человека EA-hy 926) было установлено, что при времени обработки до 6 мин относительное количество жизнеспособных клеток в популяции существенно не уменьшается, а плотность популяции клеток увеличивается, что свидетельствует об улучшении клеточной адгезии в сочетании с высокой клеточной жизнеспособностью. В работе [206] композитные микроволокна поли(метилметакрилата)/органически модифицированного монтмориллонита (О-ММТ) были покрыты диоксидом титана (TiO₂) методом магнетронного распыления. Результаты показали, что осажденные анатаз-TiO₂ и рутил-TiO₂ проявили лучшую смачиваемость поверхности, не повреждая морфологию обрабатываемых материалов.

Гидроксипатит (ГАП) и керамики на основе фосфатов кальция (СаР) также широко применяются для получения биоактивных покрытий благодаря своему химическому и минералогическому сходству с основными компонентами костных тканей. Это сходство способствует хорошей биосовместимости, osteoconductive и способности образовывать прочное химическое сцепление с живыми тканями. Поскольку данные материалы являются непроводящими для их нанесения применяют ВЧ магнетронное распыление. В работе [198] на поверхность волокон из поли (L-молочной кислоты) были

распылены 4 типа композиционных мишеней из фосфата кальция с различным составом и структурой: искусственный гидроксиапатит (ГАП: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), β -трикальцийфосфат (ТКФ: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), аморфный пирофосфат кальция (АПФ: $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) и дигидрат гидроортофосфата кальция (ДГОФК: $\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) с соотношением Ca/P 1,67, 1,5, 1 и 1 соответственно. Наибольшее содержание кальция и фосфора на поверхности материала было получено при распылении мишени ДГОФК, при этом во всех случаях количество фосфора в поверхностном слое модифицированных матриц было больше, чем кальция, из-за наличия кислорода в составе матриц поли(L-молочной кислоты).

Включение антибактериальных частиц в состав осаждаемого покрытия является широко используемым подходом для придания материалам антибактериальных свойств. Магнетронное распыление медной мишени на поверхность волокон из полимолочной кислоты привело к выраженному антибактериальному эффекту в отношении штамма *E.coli* (концентрация патогенов после выдержки была в 4 раза ниже в сравнение с немодифицированным контролем) [199]. До настоящего времени о функционализации электроформованных волокон, содержащих поликапролактон (ПКЛ), с использованием метода распыления серебра (Ag) сообщалось лишь в нескольких исследованиях. В работе [200] основным матричным полимером являлся полиглицерин себацат (ПГС), тогда как ПКЛ применялся в качестве добавки для обеспечения электроформовочной способности композитного раствора. Была показана их антибактериальная активность при взаимодействии со штаммом *E.coli*: зона ингибирования была определена от 8 до 9,5 мм, в зависимости от режима, что свидетельствует о выраженной антибактериальной активности. В работе [201] предложен способ получения антибактериальных материалов за счет осаждения наночастиц серебра (Ag НЧ) на поверхность ПКЛ волокон методом магнетронного распыления. Было продемонстрировано, что обработка не приводит к существенным изменениям морфологии образца, при этом на поверхности формируются наночастицы Ag размером ~20 нм. Антибактериальные тесты показали высокую эффективность модифицированных матов в отношении грамотрицательного штамма *Escherichia coli*: через 4 ч детектировалось снижение концентрации КОЕ на 4 порядка.

При разработке новых многокомпонентных биоактивных пленок ключевое значение имеет оптимизация их элементного и фазового состава. В этом контексте такие элементы, как титан (Ti), тантал (Ta), цирконий (Zr), кальций (Ca), фосфор (P), углерод (C), азот (N) и кислород (O), рассматриваются как перспективные компоненты для модификации материала с целью ускорения процессов остеоинтеграции и повышения биосовместимости [202–204].

Ранее было получено многообещающее биоактивное покрытие как на поверхности титана[205], так и на поверхности политетрафторэтилена (ПТФЭ) [206], обладающее следующими характеристиками: отрицательный поверхностный заряд при pH 7, хорошая смачиваемость (гидрофильность), биологическая активность (рост активности ЩФ в 1,6 раза в отношении немодифицированного контроля), высокая биосовместимость. Покрытие было получено за счет магнетронного распыления композиционной мишени состава $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Применение данного покрытия для модификации свойств субмикронных ПКЛ волокон является перспективным направлением.

1.3 Выводы из литературного обзора

На основании критического анализа современной научной литературы, проведенной в первой главе, показано, что субмикронные волокна на основе полимера поликапролактона (ПКЛ) имеют высокий потенциал для применения в биоразлагаемых фильтрующих материалах и регенеративной медицине. Для повышения эффективности их использования материалам необходимо придать дополнительные свойства: в случае фильтров - высокие антибактериальные/противовирусные характеристики для предотвращения вторичной контаминации, при использовании в регенеративной медицине - биоактивные свойства для повышения скорости регенерации и локальный антибактериальный эффект для минимизации стадии воспаления. Поверхностная модификация субмикронных волокон является перспективным методом улучшения биоактивных и бактерицидных характеристик материала. Использование плазменной полимеризации в реакционных средах имеет многочисленные преимущества перед плазменной активацией, а именно более высокая плотность функциональных групп, лучшая стабильность во времени и, в целом, лучшая повторяемость результатов в лабораторных условиях. Введенные функциональные группы улучшают биосовместимость, способствуют сорбции ионов и биомолекул в биологических средах, а также открывают возможности по иммобилизации биоактивных соединений. Литературный обзор показал, что использование плазменной системы с участием CO_2 для создания реакционноспособных карбоксильных групп на поверхности плазменно-осажденных полимерных покрытий недостаточно изучено.

Альтернативным подходом для повышения гидрофильных и биоактивных свойств, а также придания антибактериальных характеристик нано- и субмикронным волокнам ПКЛ является осаждение биоактивных бактерицидных покрытий методом магнетронного распыления. Данная технология широко применяется для модификации имплантатов на

основе титановых сплавов, однако требует тщательного подбора параметров при модификации термочувствительных полимерных материалов. Покрытия, полученные магнетронным распылением ранее разработанной композиционной мишени состава $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, показали биоактивность при обработке титановых имплантатов и термостабильных полимеров, однако результатов по осаждению биоактивных слоев на термочувствительные полимерные материалы не было опубликовано.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Синтез ПКЛ волокон

Волокна, используемые в качестве субстрата, были приготовлены методом электроформования растворов ПКЛ (80000 г/моль, Sigma Aldrich, Германия). Гранулированный полимер ПКЛ растворяли в смеси уксусной кислоты (2 весовых части, 99%, Sigma Aldrich, Германия) и муравьиной кислоты (1 весовая часть, 98%, Sigma Aldrich, Германия) [54,163,203,207,208,221]. Концентрация ПКЛ варьировалась от 10 до 25 вес. %[207]. После добавления к полимеру растворителей, смесь подвергали перемешиванию в течение 16 часов при комнатной температуре, добиваясь полного растворения, после чего проводили процесс электроформования с использованием лабораторной установки Super-ES2 (Индия)[207].

Раствор ПКЛ подвергали электрораспылению с использованием проводного электрода длиной 20 см. Подаваемое напряжение варьировали от 30 до 50 кВ. Расстояние между высоковольтным и заземляющим электродами было установлено равным 180 мм. Коллектор вращался со скоростью 500 об/мин; скорость подачи полимера варьировали в диапазоне 0.1-0.9 мкл/сек. Схема установки приведена на Рисунке 8. Полученные волокнистые материалы были компактными, гибкими и однородными с толщиной ~100 мкм. Образцы, полученные на оптимизированном режиме, в дальнейшем обозначали как ПКЛ, разрезали на кусочки размером $5 \times 5 \text{ см}^2$ и модифицировали, как описано ниже.

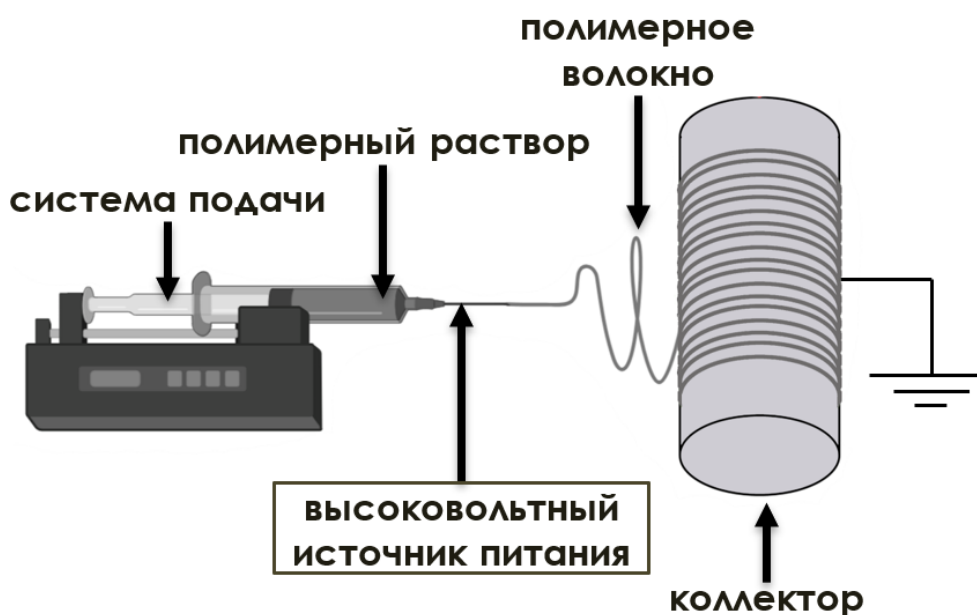


Рисунок 8 – получение субмикронных волокон из раствора ПКЛ на установке электроформования Super ES2

2.2 Разработка метода получения и оптимизация химического состава плазменно-осажденных полимерных пленок из смеси газов $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4/\text{Ar}$

Плазмо-химическое осаждение полимерных пленок проводили с использованием вакуумной системы UVN-2M, оснащенной роторно-пластинчатым и паромасляным диффузионным насосами, обеспечивающими остаточное давление в вакуумной камере ниже 10^{-3} Па. Высокочастотная (ВЧ) плазма с емкостной связью генерировалась с использованием источника питания RF Cito 1310-ACNA-N37A-FF (Comet), подключенного к дисковому генератору (антенне) RFPG-128 (Beams & Plasmas) диаметром 135 мм, установленного в вакуумной камере. ВЧ-мощность составляла 500 Вт. Рабочий цикл (РЦ) варьировался от 5 до 33%. Время осаждения составляло 15 мин. В качестве прекурсоров для реакционной смеси использовались газы Ar (99,998%), CO_2 (99,995%) и C_2H_4 (99,95%). Контроль расхода газа осуществлялся с использованием системы Multi GasContoller 647C (MKS). Рабочее и остаточное давление газа измерялось блоком VMB-14 (Tokamak Company) и контроллерами D395-90-000BOC Edwards. Расстояние между ВЧ-электродом и подложкой было установлено равным 8 см [54,208]. ИК-прозрачные пластины кремния Si (111) размером $1 \times 1 \text{ см}^2$ были использованы в качестве материала подложки и помещены на заземленный электрод (Рисунок 9) [54,208].

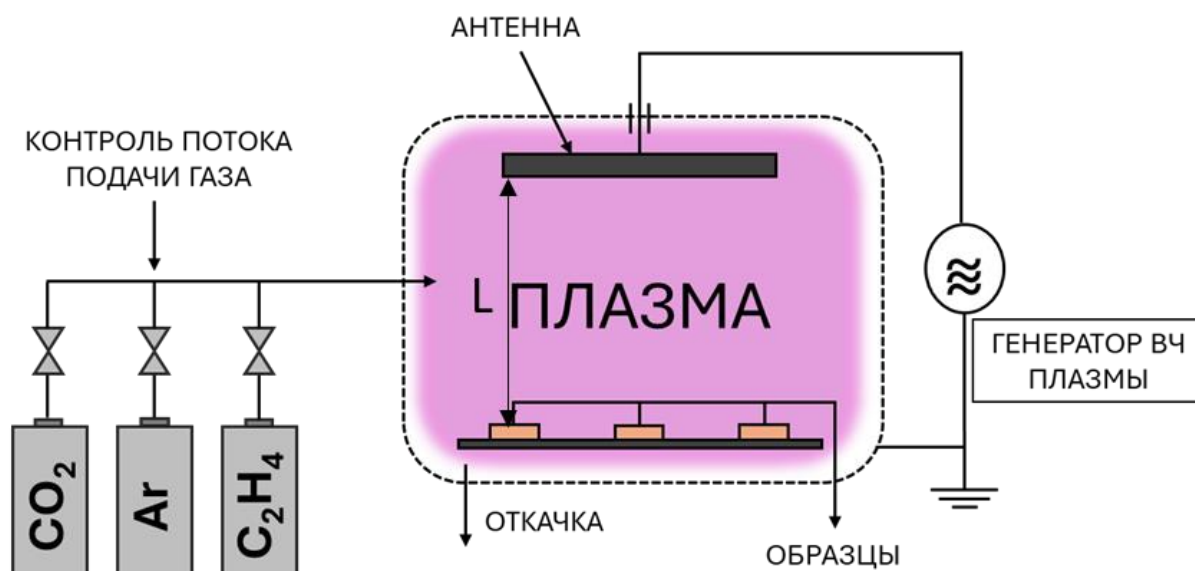


Рисунок 9 – Схема плазменной обработки образцов

Подложки очищали в изопропиловом спирте в течение 5 минут с использованием ультразвуковой установки UCS 40 MF (Optimal Technologies Ltd, Великобритания). Плазменную обработку проводили при фиксированной мощности 500 Вт. Было изучено

влияние рабочего цикла (РЦ) и соотношения потоков газов R ($R = Q(\text{CO}_2)/(Q(\text{CO}_2) + Q(\text{C}_2\text{H}_4))$), где $Q\text{CO}_2$ и $Q\text{C}_2\text{H}_4$ скорости потока газов CO_2 и C_2H_4) на структуру и состав плазменно-осажденных полимерных пленок. Кроме того, было изучено влияние добавления H_2 в газовую смесь на химический состав осажденных слоев. Газ H_2 (99,99%) был получен в результате разложения дистиллированной воды с использованием электролизера CAM1-30 (Regnatiss Company) мощностью 350 Вт. Условия плазменной обработки приведены в Таблице 6.

Таблица 6 – Режимы плазмо-химического осаждения полимерных пленок из смеси газов $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4/\text{Ar}$

R	$Q(\text{CO}_2)$, см ³ /мин	$Q(\text{C}_2\text{H}_4)$, см ³ /мин	$Q(\text{Ar})$, см ³ /мин	$Q(\text{H}_2)$, см ³ /мин	РЦ	P, Па
0.135	2.5	16	50	0	5	3.5
0.350	8.6	16	50	0	5	4.0
0.391	10.3	16	50	0	5	4.0
0.723	16.2	6.2	50	0	5	3.8
0.839	16.2	3.1	50	0	5	3.6
0.391	10.3	16	50	0	15	4.1
0.391	10.3	16	50	0	33	4.3
0.391	10.3	16	50	10	15	4.3

2.3 Оптимизация процесса плазменного осаждения полимерных пленок из смеси газов $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4/\text{Ar}$ на поверхность термочувствительных волокон ПКЛ

Для плазменного осаждения полимерных пленок из смеси газов $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4/\text{Ar}$ на поверхность ПКЛ волокон образцы размещали на расстоянии 8 см от ВЧ-электрода и варьировали время обработки от 3 до 10 мин. Для контроля за составом осажденного полимера рядом с образцами из ПКЛ размещали ИК-прозрачные пластины кремния Si (111) размером 1×1 см². Контроль за сохранением морфологии проводили с использованием СЭМ анализа. Степень деструкции определяли за счет анализа СЭМ-изображений с использованием программного обеспечения ImageJ 1.53t. Для каждого из режимов обработки был проведен анализ 10 микрофотографий СЭМ. Полученные образцы в дальнейшем обозначали как ПКЛ-СООН.

2.4 Распыление композитной мишени $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ на поверхность ПКЛ волокон

Для осаждения покрытий использовали композитную мишень состава $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, полученную методом самораспространяющегося высокотемпературного синтеза (СВС) [209,210]. Эксперименты по осаждению покрытий методом магнетронного распыления проводились на установке «UNICOAT 900» [211]. В качестве подложек использовали предварительно полученные волокна ПКЛ и кремниевые пластины (Si). Кремниевые пластины (предварительно очищенные в изопропиловом спирте) использовались в качестве контроля для анализа химического состава и структуры осаждаемых покрытий. Из-за относительно низкой температуры плавления ПКЛ ($T_{\text{пл}} \sim 60^\circ\text{C}$), ранее оптимизированные режимы осаждения TiCaPCON , определенные для подложки Ti, были кардинально снижены [212,213]. Поэтому в настоящем исследовании нановолокна ПКЛ и пластины кремния Si были установлены на расстоянии (200 мм) от магнетрона. Ток магнетрона для мишени размером 750x75 мм, составлял от 2,5 до 1,5 А (для разных экспериментов). Время осаждения составляло 10 мин. Расход Ar (99.995%) и N_2 (99.999%) был установлен равным 250 и 25 $\text{cm}^3/\text{мин}$ соответственно. Полученные образцы в дальнейшем обозначали как ПКЛ-TiCaPCON-1,5 А/2 А/2,5 А, соответственно.

2.5 Химическая дериватизация для определения количества карбоксильных групп в составе плазменно-осажденного полимерного покрытия

Для количественной оценки концентрации карбоксильных групп $[\text{COOH}]$ в плазменно-осажденных полимерных пленках, образцы подвергали взаимодействию с трифторэтанолом (ТФЭ) с использованием метода, описанного в работе [214]. Образцы помещали на предметное стекло внутри колбы объемом 100 мл. 0,9 мл ТФЭ (99%), 0,4 мл пиридина (99,8%) и 0,3 мл N, N'-ди-трет-бутилкарбодиимида (99%, все реактивы от фирмы Sigma Aldrich) прикапывали на дно колбы с интервалом 15 мин. Реакция протекала в закрытой колбе при комнатной температуре (25°C) в течение 1,5 часов. Атомная концентрация карбоксильных групп $[\text{COOH}]$ была оценена из C1s спектров РФЭС после дериватизации с использованием уравнения (1), где $[\text{C}]$ и $[\text{F}]$ являются атомными концентрациями углерода и фтора:

$$[\text{COOH}] = \frac{[\text{F}]}{3[\text{C}] - 2[\text{F}]} [\text{C}] \quad (1)$$

2.6 Изучение состава и структуры покрытий

Химический состав поверхностей образцов изучался методом РФЭС с использованием спектрометра Axis Supra (Kratos Analytical). Максимальный боковой размер анализируемой области составлял 0,7 мм. Во избежание дифференциальной зарядки образцов, спектры получали с нейтрализацией заряда в сверхкомпенсированном режиме. Впоследствии спектры были нормализованы путем смещения углеводородной составляющей CH_x до 285,0 эВ. Спектры были получены при энергии пропускания 20 эВ. Идентификация пиков РФЭС C1s, O1s, N1s, Ti2p, Ca2p, Ag3d была сделана с помощью программного обеспечения CasaXPS (версия 2.3.17) после вычитания фона по методу Ширли с использованием пиков Гаусса – Лоренца (GL) с отношением компонент Гаусс/Лоренц 70/30 [203, 208]. Значения энергий связи (ЭС) C, O, N окружений были взяты из литературы [215,216].

Наличие химических связей и функциональных групп на поверхности покрытий были также изучены методами ИК-спектроскопии с помощью приставки ATR (полного внутреннего отражения) на вакуумном ИК-Фурье спектрометре «Vertex 70v» (Bruker). Данные регистрировали в спектральном диапазоне 400–4000 см^{-1} при давлении 250 Па с разрешением 4 см^{-1} и 100 сканирований на спектр.

Наноструктуру нановолокон изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием микроскопа JEM F7600 (Jeol Ltd., Токио, Япония) при ускоряющем напряжении 0,1–30 кВ и разрешении 0,6 нм при 5 кВ. Микрофотографии СЭМ были получены при ускоряющем напряжении 15 кВ и времени набора спектров 1 мин. Для компенсации поверхностного заряда образцы покрывали слоем Pt толщиной ~ 5 нм с помощью магнетронного распыления. Данный микроскоп также оснащен приставкой рентгеновского микроанализа INCAx-sight, с помощью которой был изучен элементный состав образцов.

Оценку толщины покрытий проводили с использованием фазово-модулированного эллипсометра (JobinYvon UVISSEL) в спектральной области 1,5–6,5 эВ при угле падения 65°. Данные были подобраны с использованием дисперсионной модели PJDOS для SiO_2 -подобных материалов и структурной модели клиновидной неоднородной тонкой пленки [217].

2.7 Методика изучения смачиваемости поверхности покрытий

Гидрофильные свойства разработанных покрытий на поверхности ПКЛ волокон оценивали методом измерения угла смачивания по модели «лежащей капли» с

использованием оборудования Easy Drop Kruss (KRÜSS, Германия). В качестве тестовой смачивающей жидкости применяли дистиллированную воду. Измерительная установка оснащена цифровой видеокамерой формата FireWire (IEEE 1394) и программным обеспечением C200SW, что позволяет регистрировать видеоизображение капли и осуществлять автоматизированный анализ геометрических характеристик её профиля в реальном времени[221].

2.8 Методика исследования биоактивности покрытий в растворе, моделирующем внутреннюю среду организма

Раствор, моделирующий внутреннюю среду организма, был приготовлен из реагентов, перечисленных в Таблице 7 согласно протоколу, описанному в работах [218,219]. В качестве контрольных образцов использовали немодифицированные нановолокна (ПКЛ). Для оценки стабильности материалов в условиях, имитирующих физиологическую среду организма, образцы инкубировали в 30 мл модельного раствора при температуре 37 °C в течение 14 дней. Раствор заменяли каждые 3 дня для поддержания постоянных условий среды. Изменения химической структуры и морфологии поверхности оценивали методом ИК-спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на определённых временных интервалах — через 1, 3, 7 и 14 дней. Перед проведением анализа образцы извлекали из раствора и многократно промывали дистиллированной водой для удаления остатков модельной среды.

Таблица 7 – Состав раствора, моделирующего внутреннюю среду организма (SBF)[220]

Реагент	Количество (г/л)
Хлорид натрия (NaCl)	8.035
Бикарбонат натрия (NaHCO ₃)	0.355
Хлорид калия (KCl)	0.225
Двухосновной тригидрофосфат калия (K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O)	0.231
Гексогидрат хлорида магния (MgCl ₂ •6H ₂ O)	0.311
Соляная кислота (HCl, 1M)	39 мл
Хлорид кальция (CaCl ₂)	0.292
Сульфат натрия (Na ₂ SO ₄)	0.071
Трис ((HOCH ₂) ₃ CNH ₂)	6.118

2.9 Методика исследования биоактивности покрытий за счет определения активности щелочной фосфатазы

Остеобластные клетки MC3T3-E1 высевались на поверхность тестируемых

образцов (ПКЛ, ПКЛ-TiCaPCON, ПКЛ-COON), размещенных в 12-луночных планшетах, содержащих культуру DMEM/F12 (Invitrogen, США) с 10% телячьей эмбриональной сыворотки[209,221]. В следующий день среду заменяли на α -MEM (Invitrogen, США), обогащенную 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 10 мМ р-глицерофосфата. Поддержание клеточных культур осуществлялось в термостате при 37°C с регулярной заменой питательной среды каждые три дня.

Остеобласты, культивируемые в течение 14 дней на испытываемых субстратах и контрольных адгезивных стеклах, отделялись от поверхности субстрата с помощью 0,1% трипсина в ЭДТА и промывались фосфатным буфером. Далее, после центрифугирования при 7000 оборотов в минуту в течение 3 минут в центрифуге типа Эппендорф при температуре +4 °C, клетки ресуспендировали в 200 мкл буферного раствора, содержащего 0,1% тритона X100, 10 мМ буфер Трис-HCl и 5 мМ MgCl₂. Для разрушения клеток осадок подвергали 3 циклам чередования замораживания при -30°C и оттаивания в воде комнатной температуры. После центрифугирования клеток в течение 15 минут при 13 000 об/мин в центрифуге Эппендорф, из полученных супернатантов отбирали 150 мкл. Количество белка в супернатантах измеряли с помощью метода Брэдфорда, используя комплект BioRad Laboratories (США) и спектрофотометр Stat Fax 3200 (Awareness Technology Inc., США) при волновом длине 630 нм[209,221].

В качестве субстрата колориметрической реакции использовали р-нитрофенилфосфат (BioRad Laboratories, США). В 96-луночных планшетах к 20 мкл супернатанта (в трех повторях) добавляли 100 мкл р- нитрофенилфосфата, реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 60 мин. При ферментативном расщеплении бесцветного р- нитрофенилфосфата щелочной фосфатазой остеобластов образуется р-нитрофенол, имеющий желтое окрашивание. Продукт реакции определялся в области поглощения 405 нм с помощью спектрофотометра Stat Fax 3200. Активность щелочной фосфатазы оценивали по концентрации р- нитрофенола, освобождающегося в результате реакции в единицу времени на миллиграмм клеточного белка (нМ р-нитрофенола /мин/мг белка) [221].

2.10 Изучение механических характеристик волокон ПКЛ, ПКЛ-COON, ПКЛ-TiCaPCON

Для оценки механического поведения нановолокон были проведены квазистатические одноосные испытания на растяжение при комнатной температуре. Прямоугольные образцы размером 7x2 см вырезались из центральной части электроформованного материала и испытывались на универсальной испытательной

машине Zwick Roell Z020 (Zwick GmbH & Co. KG, Германия) в соответствии с ГОСТ 11262-2017. Для повышения достоверности результатов для каждого образца проводилось по три испытания с последующим усреднением данных и расчетом стандартного отклонения. Образцы закреплялись в захватах испытательной машины и подвергались растяжению со скоростью 10 мм/мин до разрушения. В ходе испытаний регистрировались значения силы (P) и перемещения (Δl), которые использовались для определения предела прочности (σ), относительного удлинения (ε) и модуля Юнга (E) с использованием уравнений (2), (3) и (4), соответственно.

$$\sigma = \frac{P}{A_0}, MPa \quad (2)$$

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \times 100\%, \% \quad (3)$$

$$E = \tan \alpha, MPa \quad (4)$$

где A_0 – площадь поперечного сечения образца, Δl – изменение длины образца, l_0 – начальная длина.

Предел прочности и относительное удлинение были определены для всех материалов до разрыва, а модуль Юнга рассчитывался как наклон начального линейного участка кривой зависимости напряжения от деформации.

2.11 Методика электростатического присоединения гентамицина к поверхности плазменно-модифицированных скаффолдов ПКЛ-СООН

С целью придания плазменно-модифицированному материалу антибактериальных характеристик, образцы помещались в водный раствор, содержащий Гентамицин (ГМ, $C_{24}H_{27}KN_4O_{10}S$, ОАО «ДальХимФарм»). Гентамицин представляет собой антибиотик группы аминогликозидов широкого спектра действия. Концентрация раствора антибиотика составляла 40 мг/мл. К образцу ПКЛ-СООН размером $1 \times 1 \text{ см}^2$ добавляли 2 мл раствора гентамицина и выдерживали в течение двух часов. После чего образцы промывали дистиллированной водой.

2.12 Методика ковалентного присоединения гентамицина к поверхности плазменно-модифицированных волокон ПКЛ-СООН

Для ковалентного присоединения гентамицина к поверхности нановолокон использовали методы карбодиимидной химии. К образцам ПКЛ-СООН размером $1 \times 1 \text{ см}^2$ добавляли 100 мкл раствора дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) ($C=2 \text{ мг/мл}$, ДМСО-вода

1:9) с целью активации карбоксильных групп[244]. После выдержки в течение 15 мин, образцы промывали дистиллированной водой и помещали в раствор гентамицина при $\text{pH}=7.4$. Образцы выдерживали два часа в растворе и промывали дистиллированной водой.

2.13 Методика изучения кинетики выхода антибиотика гентамицина в раствор

Образцы с антибиотиком погружали в пробирки, заполненные фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ, $V=5$ мл, $C=0.01\text{M}$, pH 5.2, 7.4 и 8.2,) при комнатной температуре. Для изучения кинетики выхода гентамицина из материалов ПКЛ-ГМ_{ков} и ПКЛ-ГМ_{ион} отбирали аликвоты раствора объемом 500 мкл через 3, 8 и 12 ч и далее через 1, 3, 5 и 7 дней[244]. После каждого отбора пробы, объем раствора увеличивали до исходного путем добавления 500 мкл свежего буферного раствора. Кинетику высвобождения антибиотика изучали с помощью УФ-спектрофотометра (Ocean Optics, США). Измерения проводились в диапазоне длин волн 200-500 нм. Пик поглощения для гентамицина находится на длине волны 230 нм. Для построения калибровочной кривой измеряли поглощение растворов антибиотиков с концентрациями в диапазоне 0,005-4 мг/мл. Концентрацию антибиотика, высвобождаемого в ФСБ с течением времени, оценивали путем сравнения с калибровочной кривой. Эксперименты по высвобождению лекарственного средства проводились в трех повторах для каждого типа гентамицин-модифицированных образцов[244].

2.14 Введение ионов Ag в состав TiCaPCON-покрытых ПКЛ скаффолдов

Эксперименты по осаждению покрытий методом магнетронного распыления и одновременной ионной имплантации проводились на установке УВН-2М в смеси $\text{Ar}-15\%\text{N}_2$ (мольная доля). Распыление композиционной мишени диаметром 125 мм состава $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ для осаждения биоактивного базового покрытия осуществлялось при следующих режимах: давление 0,1 Па, ток магнетрона 0,5 А, дистанция до подложек 200 мм[203,204]. Введение серебра осуществлялось с использованием ионного имплантора «Сокол 50/20» при одновременном распылении композиционной мишени. Расстояние от ускоряющей оптики имплантора составляло 350 мм. После совместного осаждения покрытия и ионной имплантации серебра через 2, 3 или 5 минут, в части экспериментов выключали источник магнетронного распыления и проводили дополнительную ионную имплантацию серебра в течение 4, 10 и 15 мин. Ионную имплантацию проводили при ускоряющем напряжении 15 кВ и токе 5 мА[203,204].

2.15 Теоретическое моделирование распределения ионов серебра в составе TiCaPCON-покрытых волокон ПКЛ скаффолдов

Было проведено моделирование процесса ионной имплантации с использованием программного обеспечения SRIM 2013 (метод Монте-Карло) на основе TRIM алгоритмов. Данное программное обеспечение разрабатывалось для моделирования процесса ионной имплантации в материалы и дает достаточно достоверные результаты [222].

2.16 Синтез и характеристика наночастиц ZnO

Наночастицы оксида цинка (ZnO) были получены двухстадийным методом. На первой стадии в раствор этиленгликоля (365 мл), содержащий ацетат цинка $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,0125 М), по каплям при постоянном перемешивании добавляли водный раствор гидроксида лития LiOH (0,159 М, 80 мл). Скорость добавления составляла 80 мл/час. Реакционную смесь выдерживали при температуре 5 °С в течение 2 часов, после чего проводили микроволновое гидротермальное разложение в автоклаве при 200 °С в течение 40 минут с использованием микроволновой печи Ethos Easy (Milestone, Италия). После наночастицы отделяли центрифугированием, многократно промывали деионизированной водой для удаления остаточных солей и сушили при комнатной температуре.

Размер частиц определяли по СЭМ-изображениям, вычисляя среднее значение (>100 НЧ ZnO). Исследования НЧ ZnO с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), включая ПЭМ высокого разрешения и сканирующую просвечивающую электронную микроскопию в режиме кольцевой темнопольной съёмки на высоких углах рассеяния (HAADF) STEM/TEM, проводились на установке FEI Technai Osiris 200 keV S/TEM, оснащенной источником электронов X-FEG. Карты элементов были получены с помощью системы детектирования FEI Super-X EDX. Для STEM-анализа использовался детектор HAADF. Химический и фазовый составы определяли методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) с использованием детектора X-Max EDX 80 мм² (Oxford Instruments, Belfast, UK), ИК-Фурье спектроскопии на вакуумном спектрометре Vertex 70v (Bruker, Bremen, Germany) и РФЭС анализа, который проводили на спектрометре PHI VersaProbe III (ULVAC-PHI Inc., Osaka, Japan). Размер, распределение и дзета-потенциал НЧ ZnO определяли на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, Великобритания). Рентгеновские дифрактограммы (РФА) измеряли на приборе Difrey-402 (Научные приборы, Россия), оснащенном позиционно-чувствительным детектором. В экспериментах использовалось излучение $\text{CrK}\alpha$ ($\lambda = 2,2909 \text{ \AA}$) и время

экспозиции составляло 300 с [227].

2.17 Получение композитных материалов ПКЛ- ZnO

Плазменно-обработанные волокна ПКЛ (ПКЛ-COOH) погружали в водную суспензию наночастиц ZnO ($C = 2$ мг/мл) на 1 ч, после чего промывали дистиллированной водой. Полученные материалы обозначались как ПКЛ-ZnO[207].

2.18 Методика изучения кинетики выхода ионов серебра/цинка в раствор

Выход ионов серебра/цинка из состава композитных материалов на основе волокон ПКЛ изучали методом масс- спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП) на установке X- Series II (Thermo Scientific, США). Образец помещался в физиологический раствор объемом 40 мл. Через равные промежутки времени в течение 7 дней отбирались пробы объемом 2 мл. Полученная проба разбавлялась 3%-ным раствором азотной кислоты. Длительность одного измерения составляла 60 мсек. Каждый образец измерялся 3 раза. Объем использованной пробы составлял 1 мл. В качестве внутреннего стандарта использовали раствор In, концентрация которого в каждой пробе составляла 10 мкг/л[202, 207].

2.19 Методика исследования биосовместимости образцов

Для оценки биосовместимости покрытий был выполнен морфометрический анализ распределения клеток на исследуемых материалах с применением программного обеспечения ImageJ. В ходе эксперимента клетки линий MC3T3-E1 (остеобластные клетки) и IAR-2 (эпителиальные клетки) размещались на образцах, расположенных в 12-луночных планшетах с культуральной средой DMEM/F12 (Invitrogen, США), обогащенной 10% телячьей эмбриональной сывороткой (РАА, Австрия). Инкубация проводилась в термостате при температуре 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂ [221, 244].

По истечении 24 часов клетки подвергались фиксации 3,7% раствором параформальдегида, после чего их мембраны обрабатывались 0,5% раствором Тритона X100 в течение трех минут. Далее образцы подвергались инкубации с первичными моноклональными антителами к белку паксиллину (BD Transduction Laboratories, США) в разведении 1:200 на протяжении 30 минут. После трехкратной промывки фосфатным буферным раствором осуществлялась инкубация с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем TRITC (Sigma, США), а также с фаллоидином, меченным Alexa488 (Molecular Probes, США) [221, 244].

Микроскопическое исследование выполнялось на приборе Axioplan (Zeiss, Германия) с использованием масляного объектива х63 и камеры высокого разрешения C8484-05 (Hamamatsu, Япония). Для каждого образца фотографировалось по 30 клеток в двух флуоресцентных каналах (ex/em - 488 нм/515 нм и ex/em - 570 нм/602 нм). С помощью программы Image J 1.53t производилось измерение площади клеток путем обрисовки их контуров с последующим расчетом средних значений для каждого образца[221, 244].

Анализ актинового цитоскелета и фокальных адгезий с применением флуоресцентно-меченных реагентов позволял оценить адгезивные свойства исследуемых материалов. Для этого использовался метод двухканальной флуоресцентной микроскопии.

Оценка жизнеспособности клеток на исследуемых подложках проводилась посредством теста на пролиферацию. Клетки MC3T3-E1 и IAR-2 высевались на образцы в 12-луночные планшеты с культуральной средой DMEM/F12 (Invitrogen, США) и 10% телячьей эмбриональной сывороткой (РАА, Австрия). Инкубация осуществлялась при 37°C с заменой среды на свежую на 3-й и 5-й день. На 1-й, 3-й и 5-й день клетки фиксировались 3,7% параформальдегидом и обрабатывались 0,5% Тритоном X100. Клетки MC3T3-E1 окрашивались флуоресцентным красителем DAPI (Sigma, США) и монтировались на предметные стекла. Исследование препаратов выполнялось на микроскопе Axioplan (Zeiss, Германия) с объективом х40 и камерой C8484-05 (Hamamatsu, Япония). Плотность клеточной популяции определялась путем подсчета клеток в 30 полях зрения с последующим расчетом среднего значения[221, 244].

2.20 Методика исследования антибактериальной активности ПКЛ волокон с терапевтическим агентом

Тестируемые образцы (размер $1 \times 1 \text{ см}^2$) предварительно стерилизовали УФ-излучением с экспозицией 60 мин на расстоянии 15 см от излучателя. Культивирование микроорганизмов проводили в стерильном культуральном 12-луночном планшете «Corning® Costar®». Антипатогенная активность модифицированных образцов изучалась против госпитальных бактериальных штаммов и грибковых штаммов (Таблица 8).

Для изучения антипатогенной активности планктонных форм образцы погружали в растворы патогенов: физиологический раствор (ФР, NaCl = 9 г/л водный), содержащий 10^7 КОЕ/мл (для бактериальных культур) и 10^4 КОЕ/мл (для грибковых культур). Через 6 и 24 ч инкубации определяли количество живых планктонных патогенов путем десятичного титрования на чашках Петри с плотной питательной средой для подсчета количества КОЕ[207].

Предотвращение образования биопленок определяли после инкубации образцов с

бактериальными/грибковыми клетками при температуре 37 °С в течение 24 ч. Образцы извлекали из лунки планшета, осторожно промывали три раза для удаления планктонных бактерий, а затем подвергали сонированию на гомогенизаторе Soniprep 150 (MSE Ltd., Сингапур). Обработку проводили в 5 мл 0,9% NaCl. Чем меньше КОЕ, тем выше антибиопленочная активность образца [207].

0,1 мл свежей суспензии тестируемых микроорганизмов (0,5 стандарта Макфарланда, 10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ)) в ФР помещали на поверхность агара Мюллера-Хинтона (HiMedia) в чашку Петри. Затем тестируемые образцы помещали на поверхность агара. Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 24 часов. Степень антибактериальной активности оценивали по диаметру зоны бактериального ингибирования вокруг образца. Для статистического анализа, эксперименты повторяли три раза. Отличие считали достоверным при $p < 0,05$ [244].

Таблица 8 – Антипатогенная активность модифицированных образцов

Образцы	Метод	Патогенные штаммы
ПКЛ-ГМ _{ков} /ПКЛ-ГМ _{ион}	Агар-диффузионный тест	E. coli K-19 (низкоустойчивый штамм, МИК 0.12 мг/мл) E. coli K-261 (устойчивый штамм, МИК 128 мг/мл) E. coli K-41 (устойчивый штамм, МИК 256 мг/мл)
ПКЛ-TiCaPCON-Ag	Агар-диффузионный тест	E. coli U20, S. aureus 839, B.subtilis (Bacillus F), N.crassa wt-987/nit2/nit6
ПКЛ-ZnO	Планктонные формы	Neurospora crassa, Escherichia coli U20, Staphylococcus aureus CSA154, Candida parapsilosis ATCC90018
ПКЛ-Ag	Планктонные формы, биопленки	S. aureus CSA154, E. coli U20, Candida albicans ATCC90028, Candida parapsilosis ATCC90018 и Candida auris CBS10913

ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ ПКЛ ВОЛОКОН И ОСАЖДЕНИЕ БИОАКТИВНЫХ ПОКРЫТИЙ НА ИХ ПОВЕРХНОСТЬ

3.1 Синтез ПКЛ скаффолдов

Электроформование — это технология получения волокон нано- и субмикронного размера из полимерных растворов или расплавов под действием электростатического поля. Контроль над диаметром и морфологией нановолокон является критически важным для их применения в областях фильтрации или регенеративной медицины. Диаметр получаемых волокон в составе материала зависит как от свойств формообразующего раствора (вязкость, проводимость, молекулярная масса и концентрация полимера), так и от условий эксперимента (прилагаемое напряжение, скорость подачи раствора, расстояние между иглой и коллектором).

В данной работе в качестве формообразующего полимера был выбран поликапролактон (80000 г/моль, Sigma Aldrich, Германия) поскольку он является биосовместимым, биоразлагаемым, обладает высокими механическими характеристиками, а также одобрен для медицинского применения [223]. Было изучено влияние концентрации раствора полимера ПКЛ, прилагаемого напряжения и скорости подачи полимерного раствора в процессе электроформования на морфологию с целью получения материалов для последующих модификаций и биологических испытаний. Топография субмикронных волокон, полученных на разных режимах, проанализирована с помощью СЭМ (Рисунок 10). Сравнение СЭМ изображений обнаруживает значительные различия в морфологии (Рисунок 10) и однородности субмикронных волокон (Рисунок 11) в зависимости от концентрации поликапролактона в растворе, прилагаемого напряжения и скорости подачи полимерного раствора.

Влияние концентрации полимера на структуру волокон приведены на Рисунке 10(верхний ряд). Прилагаемое напряжение было одинаковым для всех подложек и составляло 50 кВ. Морфология образцов волокон, приготовленных из раствора с 10 мас.% полимера, показало большое количество капельных структур и бисерных волокон. Капли и бисерные волокна, скорее всего, образуются из менее концентрированных растворов, поскольку их вязкость низкая, что приводит к нестабильности струи в процессе электроформования [224]. Увеличение концентрации полимерного раствора от 10 до 25% (Рисунок 10 а-д) приводило к увеличению однородности волокон и снижению количества волокон из бисера [225,226]. При концентрации 25% ПКЛ образуется однородный волоконный материал без бисерных структур и капельных включений.

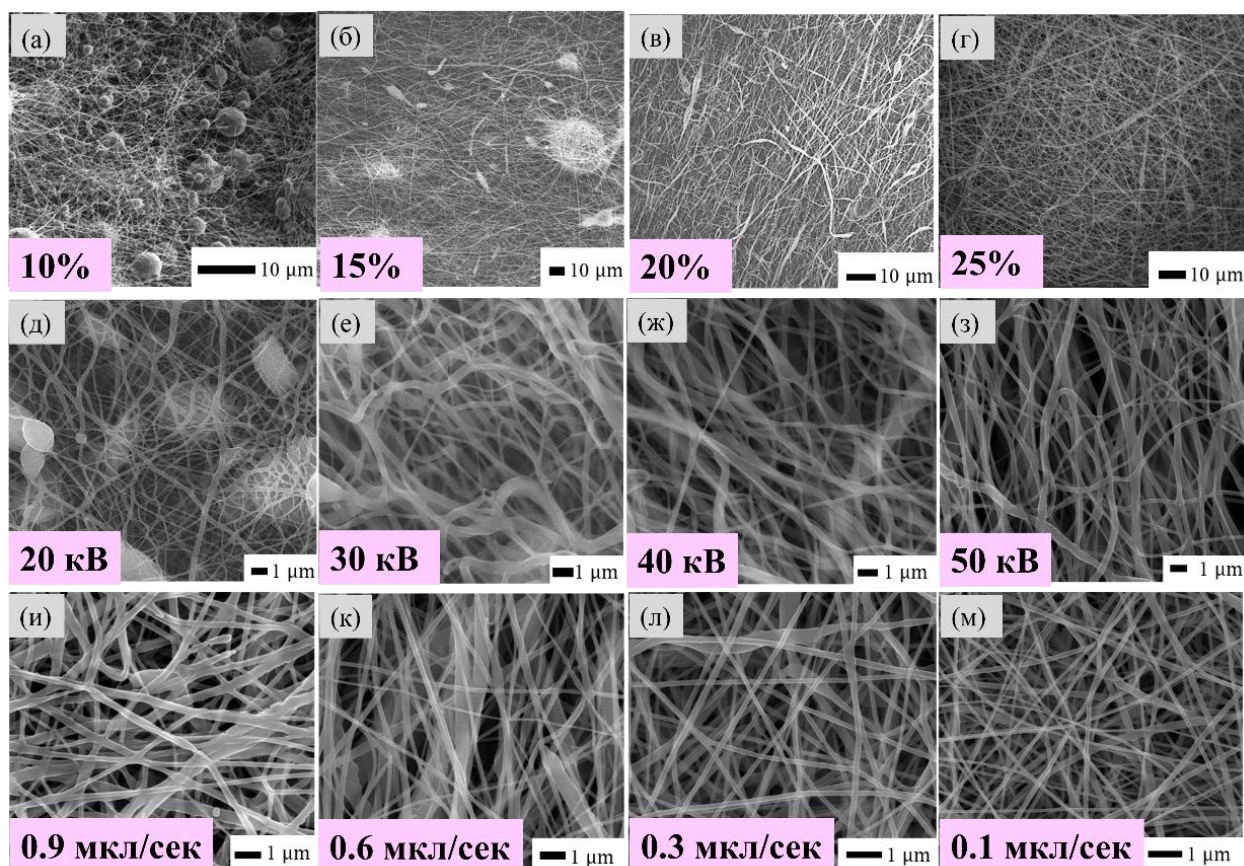


Рисунок 10 – СЭМ-микрофотографии нановолокон поликапролактона (ПКЛ), полученных из растворов с различными концентрациями поликапролактона(верхний ряд, $U=50$ кВ, $V=0.1$ мкл/сек), при различных напряжениях (средний ряд, $C=25\%$, $V=0.1$ мкл/сек) и при разной скорости подачи полимерного раствора (нижний ряд, $C=25\%$, $U=50$ кВ). Концентрация, напряжение и скорость подачи указаны на изображениях

При варьировании напряжения в диапазоне от 20 до 50 кВ (Рисунок 10 д-з, Рисунок 11 верхний ряд) наблюдали не только улучшение однородности нановолокон, но и снижение капельной фазы. Увеличение скорости потока приводит к увеличению диаметра волокна (Рисунок 10 и-л, Рисунок 11 нижний ряд) и обрыванию волокна, это можно объяснить тем, что из-за большого потока раствор не успевает высохнуть и сформировать цельное волокно. С понижением скорости потока улучшается устойчивость заряженной струи волокна, что приводит к формированию однородных и бездефектных нетканых матриксов. Смещение распределения диаметра получаемых волокон в сторону более низких значений коррелировало с уменьшением скорости подачи полимерного раствора и в меньшей степени зависело от прилагаемого напряжения.

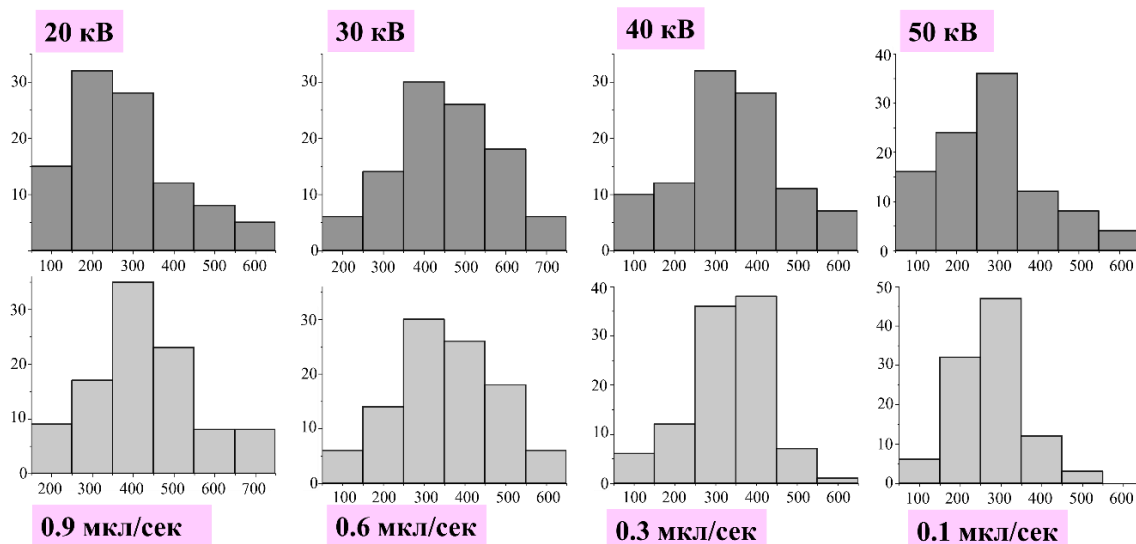


Рисунок 11 – Распределение диаметра получаемых нановолокон в зависимости от приложенного напряжения (верхний ряд) и скорости подачи полимерного раствора (нижний ряд) в процессе электроформования

Наблюдаемая тенденция соответствует известным данным по оптимизации процесса электроформования из раствора поликапролактона в уксусной кислоте с использованием установки Starter Kit 40 KVWeb [224]. Преимущество технологии, разработанной в данной работе, заключается в более высокой производительности и большем размере производимых образцов. Что касается оптимизированных условий, для дальнейших модификаций были выбраны полимерные скаффолды, сформированные из растворов с концентрацией поликапролактона 25 мас.%, приложенным напряжением 50 кВ и скоростью подачи 0.1 мкл/сек.

3.2 Изучение химического состава и стабильности плазменно-осажденных полимерных покрытий из смеси газов $\text{Ar}/\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4$. Оптимизация режима осаждения карбоксил-содержащего покрытия на ПКЛ волокна (ПКЛ-СООН)

Целью настоящего раздела было исследование влияния соотношения скорости подачи газов $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4$, рабочего цикла, а также присутствие в реагирующей смеси водорода, на химический состав, толщину слоя и стабильность плазменно-осажденных полимерных слоев (Таблица 9).

Таблица 9 – Толщина осажденного полимера и содержание групп $\text{C}(\text{O})\text{O}$ и COOH на поверхности в зависимости от режима осаждения

R	РЦ	Давление, Па	$[\text{C}(\text{O})\text{O}]$, ат. %	$[\text{COOH}]$, ат. %	Толщина, нм
0.135	5	3.5	1.7	0.13	186
0.350	5	4.0	8.0	0.25	107

R	РЦ	Давление, Па	[C(O)O], ат. %	[COOH], ат. %	Толщина, нм
0.391	5	4.0	9.7	0.33	75
0.723	5	3.8	11.3	0.57	37
0.839	5	3.6	12.6	0.77	41
0.391	15	4.1	9.4	0.30	105
0.391	33	4.3	4.3	0.10	177
0.391	15	4.1	8.6	0.27	53

Стабильность и гомогенность плазменно-осажденных полимерных покрытий

Импульсное плазменное осаждение тонких полимерных покрытий из смеси газов $\text{Ar}/\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4$ привело к образованию однородных полимерных слоев с высокой адгезией к поверхности при всех используемых параметрах осаждения. Микрофотографии СЭМ не выявили точечных дефектов, трещин или других повреждений в осажденных слоях (Рисунок 12а). Погружение плазменно-осажденных полимерных слоев в воду при комнатной температуре в течение 24 ч не привело к изменению морфологии слоя, независимо от условий осаждения (Рисунок 12б). На Рисунке 12в представлена СЭМ-микрофотография толщины осаждаемого слоя, полученного на режиме $R=0.839$ в течение 15 мин. Стоит отметить, что при увеличении расстояния между образцом и плазмогенерирующей антенной или при уменьшении времени обработки можно добиться осаждения более тонких карбоксил-содержащих полимерных слоев.

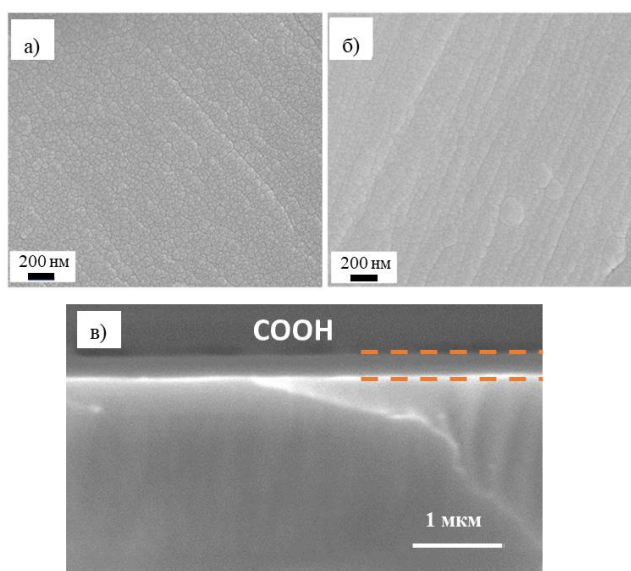


Рисунок 12 – Микрофотографии СЭМ $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4$ плазменно-осажденных полимерного слоя, полученных при соотношении реагирующих газов $R=0.391$ (а), после выдержки в воде в течение 24 ч (б), толщина плазменно-осажденного полимерного слоя при $R=0.839$ (в)

По результатам анализа ИК-спектров, плазменно-осажденные полимерные покрытия имеют признаки углеводов (что подтверждается наличием пиков C-H₃, CH₂ и CH при 2978, 2937 и 2884 см⁻¹, соответственно), карбоксильных/сложноэфирных групп (растяжение пика C(O) при 1730 см⁻¹) и гидроксильных групп (-ОН при ~3300 см⁻¹) (Рисунок 13а). Сравнение ИК-спектров плазменно-осажденных полимерных слоев до и после выдержки на воздухе в течение месяца не выявило изменений в химическом составе полимерного слоя. Погружение плазменно-осажденных полимерных покрытий в воду на 3 часа не привело к деградации слоя, что также было подтверждено данными ИК-спектроскопии и РФЭС-анализа. Напротив, погружение слоев на 24 часа привело к образованию нового пика при 1590 см⁻¹, который можно отнести к карбоксилатам. Однако этот пик может также перекрываться с амидом, так как РФЭС анализ выявил присутствие в спектре пика азота ([N] ~ 1 ат.%). Образование карбоксилатов может быть вызвано депротонированием групп карбоновой кислоты при выдержке в деионизированной воде. Погружение на 7 дней не привело к каким-либо значительным изменениям в ИК спектрах по сравнению с результатами, полученными на образцах после погружения только на 1 день (Рисунок 13а).

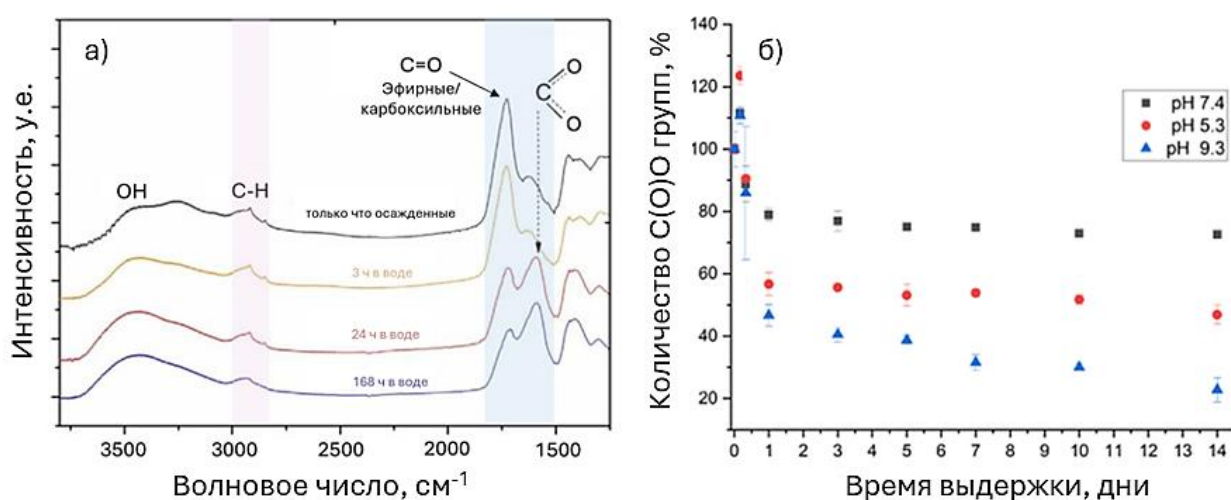


Рисунок 13 – ИК-спектры образцов после осаждения ($R=0.839$) и последующей выдержки в воде в течение 3, 24, 168 ч в воде (а); стабильность плазменно-осажденных карбоксильных/сложноэфирных групп при различных pH (б)

По результатам эллипсометрии, толщина плазменно-осажденных полимерных покрытий уменьшалась после погружения в воду на 24 часа. Наибольшая потеря толщины (примерно 39%) наблюдалась для слоя, полученного при режиме обработки с самым высоким количеством CO₂ ($R = 0,839$). При этом химическая дериватизация групп COOH показала, что концентрация карбоксильных групп [COOH] снизилась только на 0,12 ат.%,

тогда как концентрация сложноэфирных групп снизилась на ~ 8 ат.%. Можно сделать вывод о том, что растворение плазменно-осажденного полимерного слоя связано с гидролизом сложноэфирных связей, тогда как группы COOH , в основном, сохраняются даже при самой высокой скорости деградации покрытий. Следовательно, концентрация карбоксильных групп может быть увеличена путем выдержки плазменно-осажденных полимерных слоев в воде. Отметим, что предпочтительный гидролиз сложноэфирных групп может быть использован для некоторых биомедицинских применений. Например, деградирующие в водной среде слои могут быть использованы для регулируемого высвобождения лекарств из наночастиц или нановолокон.

Кроме того, была оценена стабильность карбоксильных групп плазменно-осажденных полимерных слоев при различном pH, путем выдержки пластин кремния с плазменно-осажденным полимерным покрытием в растворах с pH 4.3, 7.4, 9.3 (Рисунок 13б). Оценка количества карбоксильных групп производилась методом ИК-спектроскопии за счет интегрирования площади под пиком $1800\text{--}1500\text{ см}^{-1}$. В этом диапазоне располагаются пики, соответствующие сложноэфирным/карбоксильным группам (Рисунок 13а). Площадь, полученную в определенный момент времени t , делили на площадь под пиком, измеренную до погружения в воду и, таким образом оценивали степень деградации.

Было показано, что наибольшая деградация сложноэфирных/карбоксильных групп происходит в щелочной среде (80% за 24ч). Кислая среда также ускоряет деградацию функциональных групп (40% за 24 ч), в то время как при pH 7.4 за 8 ч степень деградации сложноэфирных/карбоксильных групп составляет около 15% и в дальнейшем не увеличивается до 72 ч. Данный результат свидетельствует о pH-чувствительности осажденных плазменно-осажденных полимерных слоев, что может быть использовано для контролируемого высвобождения иммобилизованных препаратов в ответ на изменение кислотности среды.

Влияние соотношения потоков газов (R) на химический состав слоя

Изменения состава плазменно-осажденного полимерного слоя были изучены методом ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье. Для этого вводили параметр $I_{\text{C=O}}/I_{\text{CH}}$, который рассчитывался как соотношение общей площади под пиками CO , расположенными на волновых числах $1800\text{--}1620\text{ см}^{-1}$, к площади пиков алкильных групп, расположенных при $3050\text{--}2800\text{ см}^{-1}$, и строили зависимость этого параметра от соотношения скорости потоков газов R (Рисунок 14а). Видно, что в диапазоне значений R от 0,135 до 0,391, величина отношения $I_{\text{C=O}}/I_{\text{CH}}$ увеличивалась и далее сохранялась практически на одном уровне,

порядка 12. Следовательно, концентрация химических групп, содержащих карбонильную функцию C(O), увеличивалась с увеличением концентрации потока газа CO₂ только в узком диапазоне R.

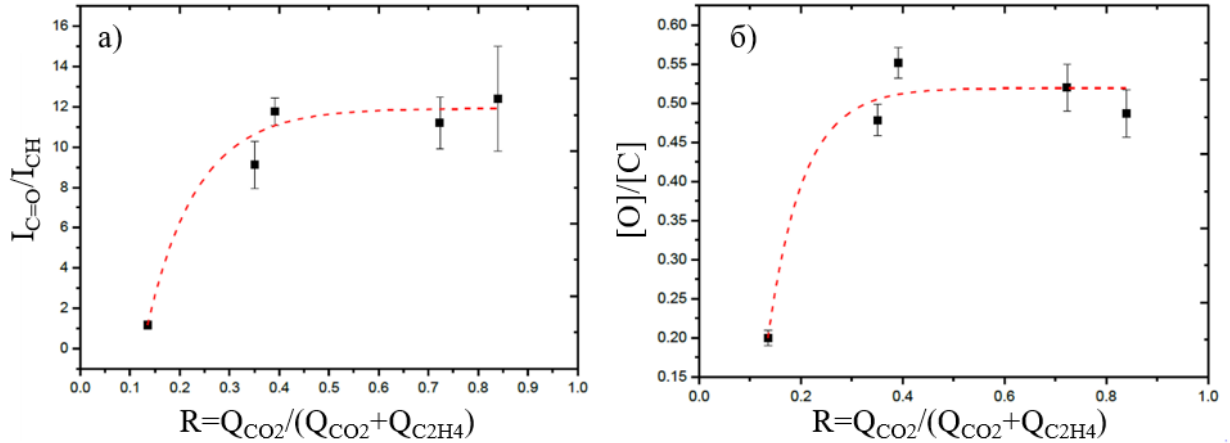


Рисунок 14 – а) Зависимость величины $I_{C=O}/I_{CN}$ от соотношения скоростей потоков газа R. Отношение $I_{C=O}/I_{CN}$ рассчитывали, как общую площадь под пиками C=O, деленную на общую площадь, занятую пиками CH_x; б) соотношение O/C как функция от соотношения газов R

Чтобы лучше понять зависимость каждой химической группы (сложный эфир, карбоксильные группы и т. д.) от газового отношения R, эти же слои были дополнительно проанализированы методом РФЭС до и после химической дериватизации. Было показано, что все плазменно-осажденные полимерные покрытия CO₂/C₂H₄ состоят только из углерода и кислорода. Увеличение R приводит к увеличению концентрации кислорода за счет углерода. Как показано на Рисунке 14б, зависимость O/C от R повторяет зависимость $I_{C=O}/I_{CN}$ от R.

Для более детального изучения химического состава плазменно-осажденных полимерных покрытий спектр РФЭС C1s (Рисунок 15а) был разложен на четыре составляющие компоненты: углеводороды CH_x (с энергией связи (ЭС) 285,0 эВ, был использован для калибровки шкалы ЭС), углерод, соединенный с кислородом двойной связью, C=O (ЭС = 287,8 ± 0,05 эВ) и углерод, однократно связанный с кислородом C-O (ЭС = 286,55 ± 0,05 эВ), и, наконец, углерод эфирной или карбоксильной группы C(O)O (ЭС = 289,0 ± 0,03 эВ). Полная ширина на половине максимума (FWHM) для всех пиков была установлена на уровне ~ 1,5 эВ.

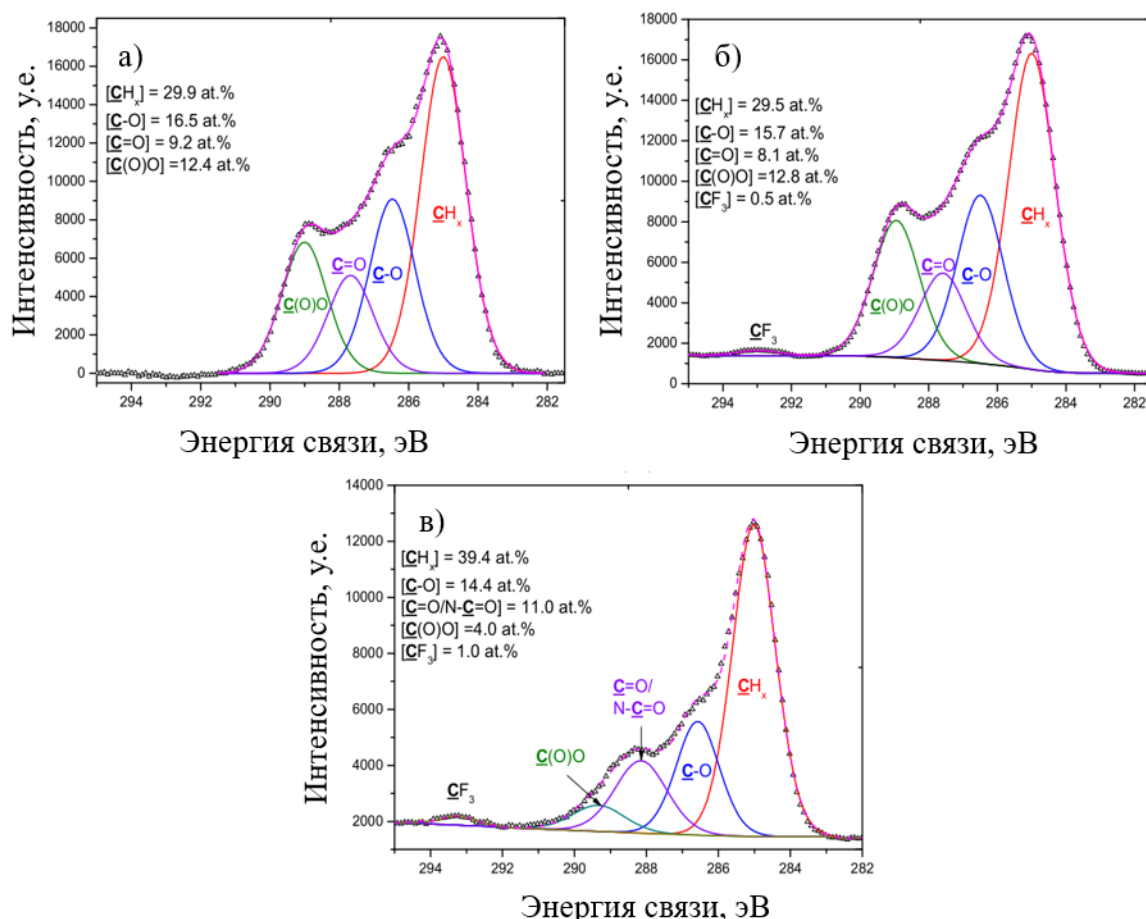


Рисунок 15 – Спектры РФЭС C1s (а) плазменно-осажденного полимерного покрытия ($R = 0,839$), (б) дериватизированного трифторэтанолом плазменно-осажденного полимерного покрытия и (в) того же образца после выдержки в воде в течение 24 ч с последующей дериватизацией

Стоит отметить, что прямой анализ спектров РФЭС C1s не может дать достоверную информацию о концентрации карбоксильных групп $[COOH]$, поскольку они перекрываются с эфирными группами $COOC$. Таким образом, мы использовали хорошо известную химическую дериватизацию трифторэтанолом (ТФЭ) [227,228] для определения $[COOH]$. Реакция между карбоксильными группами $COOH$ плазменно-осажденного полимерного покрытия CO_2/C_2H_4 и гидроксильными группами OH ТФЭ приводит к включению фтора в плазменно-осажденный полимерный слой, и концентрация фтора $[F]$ в осажденном слое зависит от $[COOH]$ согласно Уравнению 1. Кроме того, реакция между плазменно-осажденным полимерным покрытием и ТФЭ приводит к включению нового типа углерода, а именно углерода с тремя связями к фтору (CF_3). Соответствующий углеродный пик расположен при 292.8 эВ, как показано на спектре РФЭС C1s дериватизированного плазменно-осажденного полимерного покрытия CO_2/C_2H_4 (Рисунок 15б). Отметим, что кроме появления в спектре CF_3 за счет реакции этерификации между свободными карбоксильными группами и гидроксильной группой ТФЭ, газофазная

derivatизация с ТФЭ не изменила углеродную среду, и, следовательно, результаты derivatизации можно считать корректными. (Рисунок 15 б, в)

Зависимость различных углеродных состояний в зависимости от R показана на Рисунке 16. Вклады $C=O$ и $C-O$ демонстрируют ту же зависимость от соотношения газов, что и отношение O/C в зависимости от R , т.е. концентрация этих углеродных состояний возрастала с увеличением R , в то время как концентрация углеводородов уменьшалась до $R = 0.350$, а затем кривая выходила на плато при $R > 0.2$. Вклад компонента $C(O)O$ достиг максимальных значений при $R > 0.8$.

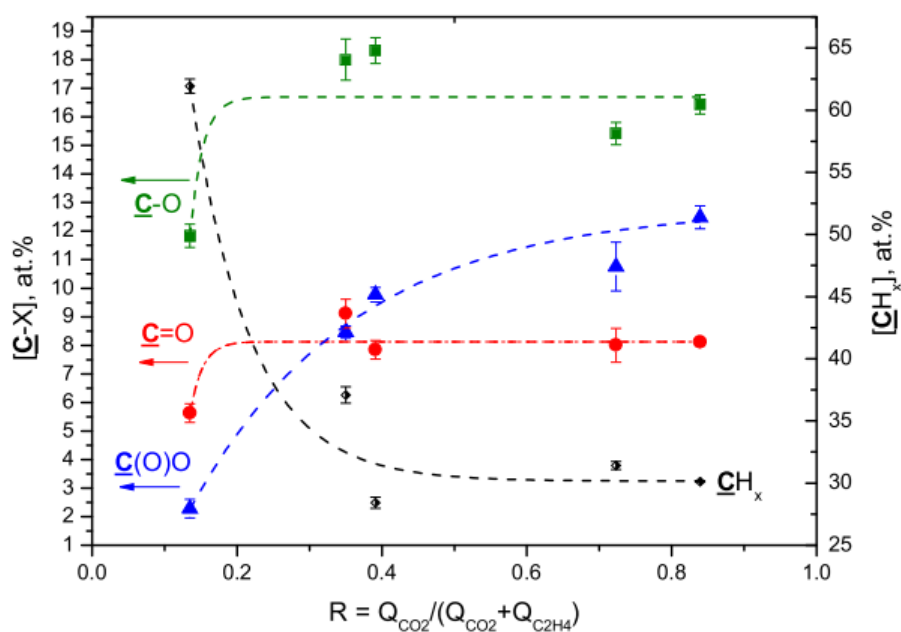


Рисунок 16 – Изменение углеродных состояний как функция от соотношения газов R

Увеличение содержания кислородсодержащих углеродных сред с увеличением R можно объяснить более высокой концентрацией кислородных радикалов и других кислородсодержащих частиц в плазме. Действительно, было высказано предположение, что присоединение групп $COOH$ из плазмы CO_2 , CO_2/H_2O и CO_2/C_2H_4 произошло вследствие взаимодействия частиц плазмы с CO_2 (CO_2^+ , CO_2^*) или посредством реакции атомарного кислорода [228] с углеводородной полимерной цепью. Следовательно, увеличение концентрации CO_2 в газовой смеси должно усиливать образование активных частиц CO_2 и, следовательно, увеличивать плотность компоненты $C(O)O$ в составе плазменно-осажденных полимерных слоев. Поскольку основным направлением нашей работы было изучение пришивки $COOH$ групп, особое внимание было уделено derivatизации карбоксильных групп и дальнейшему сравнению значений, рассчитанных

[COOH] по концентрации измеренного [F] по уравнению (1), полученные из спектра РФЭС C1s. Соответствующие зависимости [F] и [COOH] от R показаны на Рисунке 17.

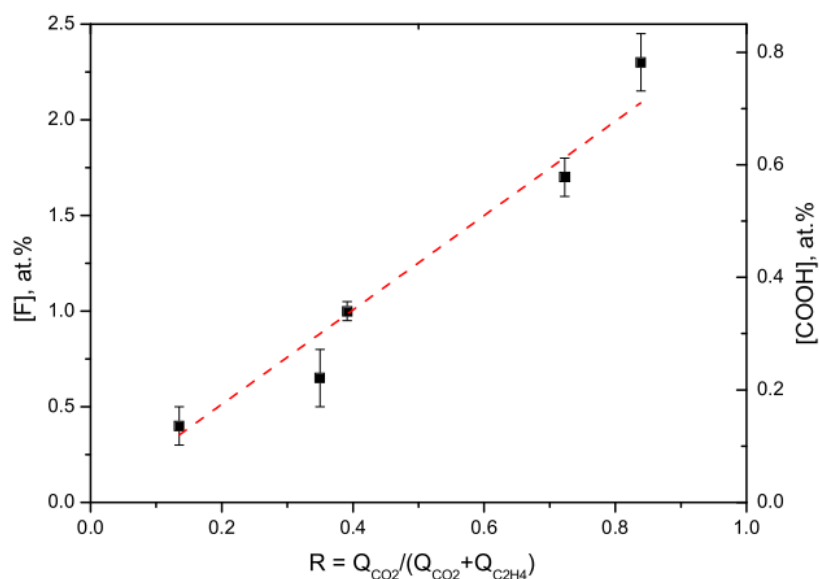


Рисунок 17 – Концентрации фтора [F] и карбоксильных групп [COOH] от соотношения газов R

Хорошо видно, что атомная концентрация фтора (максимальное значение, равное 2.2 ат.%, наблюдаемое для $R = 0.839$) значительно ниже по сравнению с концентрацией вклада C(O)O и значение $[COOH]/[C(O)O]$ варьируется в пределах от 0,03 до 0,08. Кроме того, зависимость [COOH] как функции от R значительно отличается от той, что наблюдается для параметров C(O)O, O/C и $I_{C=O}/I_{CH}$. Значения [F] и [COOH] линейно возрастают с ростом R во всем диапазоне соотношений газов R. Это означает, что увеличение концентрации CO_2 приводит к более высокому содержанию карбоксильных групп, хотя в отношениях O/C и C(O)O значение O достигает плато приблизительно при $R = 0,350–0,500$. Таким образом, увеличение концентрации CO_2 в газовой смеси приводит к увеличению отношения $[COOH]/[C(O)O]$. Следует также отметить, что значения $O/C = 0,45$ и концентрации эфирных групп $[C(O)O] = 9,7$ ат.%, полученные в нашем исследовании при $R = 0,391$ и РЦ = 5%, оказались выше, по сравнению с лучшими результатами, полученными ранее для плазменно-осажденных COOH-содержащих полимерных покрытий, синтезированных из газовой смеси CO_2/C_2H_4 с использованием ВЧ-разряда низкого давления[229]. Однако, концентрация карбоксильных групп [COOH], полученная в настоящей работе, была ниже по сравнению с [COOH], полученной при полимеризации акриловой кислоты [230,231] и малеинового ангидрида[232,233].

Влияние рабочего цикла

Данные ИК-спектров и РФЭС показали, что $I_{C=O}/I_{CH}$, $[C(O)O]$ и концентрация карбоксильных групп $[COOH]$ снижались с увеличением рабочего цикла (РЦ) (Таблица 9). Снижение плотности функциональных групп (например, $COOH$ или NH_2) обычно наблюдается для различных осажденных в плазме полимеров, и может быть объяснено либо деградацией молекул-предшественников в газовой фазе, либо ионной бомбардировкой осажденных слоев. В настоящем исследовании самое низкое используемое значение РЦ = 5% было оптимальным, поскольку покрытия демонстрировали самую высокую концентрацию карбоксильных групп ($-COOH$). Стоит также отметить, что группы $COOH$ были стабильны в воде, что следует из результатов химической дериватизации (Рисунок 15 б, в). Таким образом, увеличение РЦ не приводило к улучшению стабильности или гомогенности осажденных плазменно-осажденных полимерных слоев, а только подавляло рост концентрации $COOH$ в составе плазменно-осажденных полимерных пленок

Влияние примеси водорода

Согласно имеющимся литературным данным, включение $COOH$ группы в плазме CO_2 происходит через присоединение $-C(O)O\cdot$ радикал к углеводородной цепи с последующей рекомбинацией $-C(O)O\cdot$ с атомом водорода.[179] Если плотность атомов водорода в плазме недостаточна, то добавление водорода в газовую смесь должно увеличить плотность водородных радикалов и, следовательно, улучшить эффективность конверсии радикалов $C(O)O\cdot$ в $COOH$ группы. Чтобы проверить эту гипотезу, для одного из выбранных режимов осаждений полимерного слоя из смеси газов $CO_2/C_2H_4/Ar$ ($R = 0,391$, РЦ = 5%) в плазменную систему был добавлен поток водорода со скоростью 10 cm^3/min . Было показано, что концентрация $C(O)O$ снизилась с 9,7 до 8,6 ат.% после добавления H_2 . Дериватизация групп $COOH$ показала, что содержание $[COOH]$ составляло 0,27 и 0,33 ат.% для слоев, нанесенных с добавлением и без добавления водорода, соответственно. Поскольку добавление водорода не улучшило эффективность включения группы $COOH$, можно предположить, что рекомбинация $-C(O)O\cdot$ радикалов с водородными радикалами не является ограничивающим фактором, влияющим на присоединение $COOH$. Однако следует отметить, что добавление водорода в плазму также изменяет состав плазмы и увеличивает ВУФ-излучение. Это может привести к расщеплению групп карбоксильной кислоты фотонами ВУФ. Следовательно, влияние добавления H_2 может быть более сложным.

*Осаждение полимерных слоев $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4$ на поверхность поликапролактоновых
скаффолдов*

Особенностью скаффолдов из поликапролактона является низкая температура плавления полимера ($T_{\text{пл}}$ 62–64 °C). Таким образом, было необходимо подобрать режим осаждения полимеров $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4$ на поверхность термочувствительных нановолокон. Для этого образцы располагали на расстоянии 8 см от антенны и обрабатывали в течение 3, 5, 10 мин. Структура волокон ПКЛ после модификации была изучена методом СЭМ (Рисунок 18).

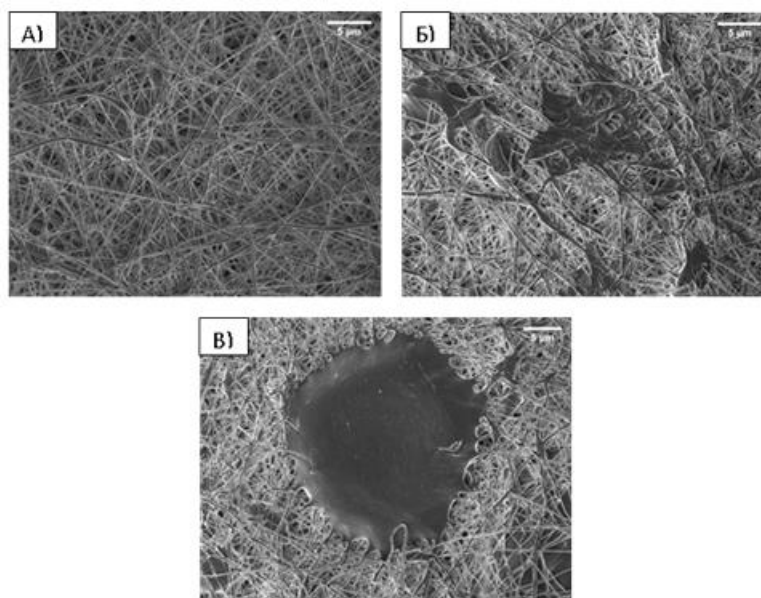


Рисунок 18 – Микрофотографии СЭМ для образцов после плазменной обработки $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4$ в течение 3 мин (а), 5 мин (б) и 10 мин (в)

Для определения степени дефектности был проведен морфометрический анализ площади дефектов к общей площади с помощью программы ImageJ (NIH, США) для 9 микрофотографий при каждом режиме. (Таблица 10) Стоит отметить, что изменение времени осаждения не оказывало существенного влияния на химический состав плазменно-осажденного полимерного покрытия.

Таблица 10 – Степень дефектности ПКЛ волокон после плазменной обработки

Время обработки, мин	Толщина слоя, нм	Степень дефектности, %	$I_{\text{C=O}}/I_{\text{CH}}$
3	30	0	12:1
5	41	15	11:1
10	56	60	12:1

3.3 Напыление биоактивного покрытия TiCaPCON на поверхность ПКЛ волокон (ПКЛ-TiCaPCON)

Чистые ПКЛ нановолокна имеют низкую биологическую активность и не поддерживают адгезию остеобластов и образование слоя гидроксиапатита (ГАП). Известно, что пленки TiPCON, легированные Ca (TiCaPCON), проявляют высокую биологическую активность, что подтверждается тестами, как *in vitro*, так и *in vivo* [234,235]. Целью данного раздела была оптимизация режима осаждения биоактивного покрытия на поверхность наноструктурированных ПКЛ волокон с сохранением их структуры. Для оптимизации процесса магнетронного распыления мишени $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ была снижена сила тока до диапазона 2.5–1.5 А (размер мишени $75 \times 750 \text{ мм}^2$), увеличена дистанция и уменьшено время обработки (10 мин). На Рисунке 19 представлены микрофотографии СЭМ для немодифицированных нановолокон и нановолокон, покрытых биоактивным слоем TiCaPCON. Осаждение с током магнетрона 2.5 А (ПКЛ-TiCaPCON-2.5А) привело к серьезным повреждениям структуры нановолокна по сравнению с немодифицированным аналогом (ПКЛ). Осаждение покрытий TiCaPCON с токами 2 и 1.5 А не оказало значительных изменений на структуру нановолокон. Шероховатость пленок TiCaPCON, осажденных на Si пластины, составляла порядка 30 нм [203, 221].

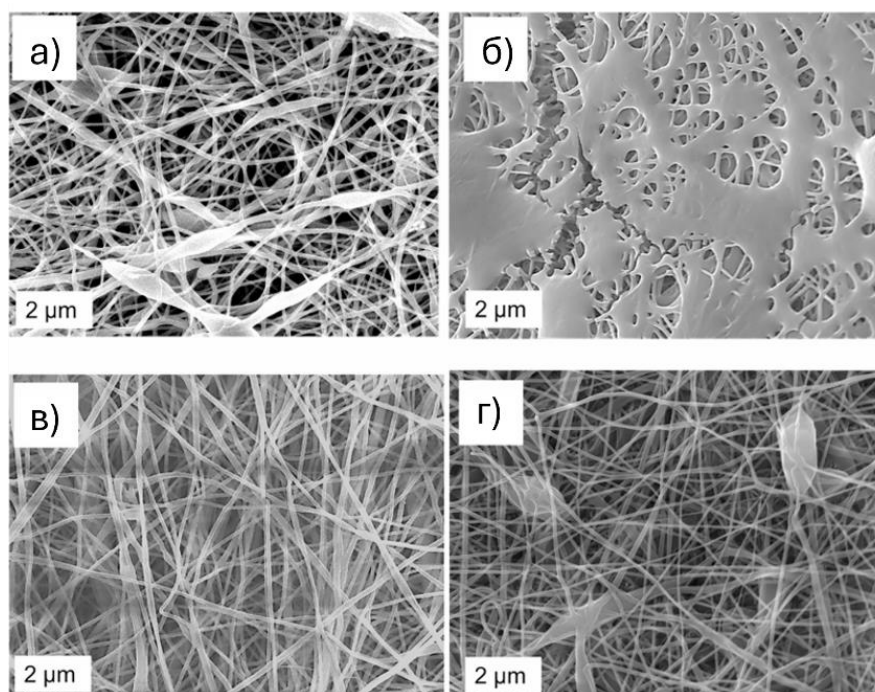


Рисунок 19 – СЭМ-микрофотографии образцов ПКЛ (а), ПКЛ-TiCaPCON-2.5А (б), ПКЛ-TiCaPCON-2А (в) и ПКЛ-TiCaPCON-1.5А (г) [203]

Анализ методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) показал, что содержание Ti в образце ПКЛ-TiCaPCON-1.5A очень низкое ($<0,1$ ат.%), что указывает на отсутствие образования сплошного покрытия TiCaPCON при токе магнетрона 1.5 А. Напротив, осаждение при токах 2 и 2.5 А привело к увеличению содержания Ti до 1.6 ± 0.1 ат.%. Учитывая, что глубина ЭДС анализа относительно высока (1-2 мкм), для более точного определения Ti проведена более чувствительная поверхностная техника, такая как РФЭС.

РФЭС-анализ ПКЛ скаффолдов с покрытием TiCaPCON (полученных при токе магнетрона 1.5, 2 и 2.5 А) показал, что произошли существенные изменения в химическом составе их поверхности по сравнению с немодифицированными волокнами. При более низком токе магнетрона 1.5 А присутствие элементов Ti и Ca не было обнаружено. Образец ПКЛ-TiCaPCON-2A показал высокую концентрацию Ti (8.4 ат.%) и N (8.6 ат.%), а также около 1.1 ат.% Ca (Таблица 11). При обработке волокон на токе 2.5 А (ПКЛ- TiCaPCON-2,5 А) наблюдали более высокое содержание титана (9.8 ат.%), но детектируемые концентрации Ca и N падали и составляли всего 0.5 и 0.8 ат.%, соответственно (Таблица 12). Следовательно, образование пленки TiCaPCON на поверхности полимерных нановолокон было подтверждено, как методом РФЭС, так и ЭДС анализа. Для тщательного анализа функционального состава поверхности были проанализированы спектры РФЭС C1s, Ti2p и N1s[203].

Таблица 11 – Элементный анализ состава поверхности образцов, полученный методом РФЭС

Образец	Сила тока, А	[C], ат.%	[O], ат.%	[Ti], ат.%	[Ca], ат.%	[P], ат.%	[N], ат.%
ПКЛ		73.9	26.1				
ПКЛ-TiCaPCON-1.5A	1.5	67.9	29.9	0	0	2.3	0
ПКЛ-TiCaPCON-2A	2.0	55.4	26.5	8.4	1.1	0	8.6
ПКЛ-TiCaPCON-2.5A	2.5	55.7	33.2	9.8	0.5	0	0.8
Si-TiCaPCON	2.0	58.4	22	9.7	1.3	0	8.7

Разложения пика РФЭС C1s для ПКЛ, ПКЛ-TiCaPCON-2.0 и Si-TiCaPCON представлены на Рисунке 20. Для ПКЛ (Рисунок 20 а) пик C1s можно разложить на четыре компоненты, а именно углеводороды C-H_x ($\text{ЭС} = 285$ эВ), эфирная группа C-O ($\text{ЭС} = 286.5$ эВ), сложноэфирная группа C(O)O ($\text{ЭС} = 289.1$ эВ) и соседние с углеродом эфирные группы C-C(O)O . Ширина пика на половине максимума (FWHM) C-O составляла 1.3 эВ, а для других пиков - 0.9 эВ. Как видно из Рисунка 20б, осаждение слоя TiCaPCON привело к

заметным изменениям в составе пика C1s: компонент C-C(O)O больше не детектировался, и появился новый компонент C=O при ~ 288 эВ. Эти результаты РФЭС свидетельствуют о том, что спектр ПКЛ-TiCaPCON-2А имеет характерные признаки спектров ПКЛ и Si-TiCaPCON (Рисунок 20 в).

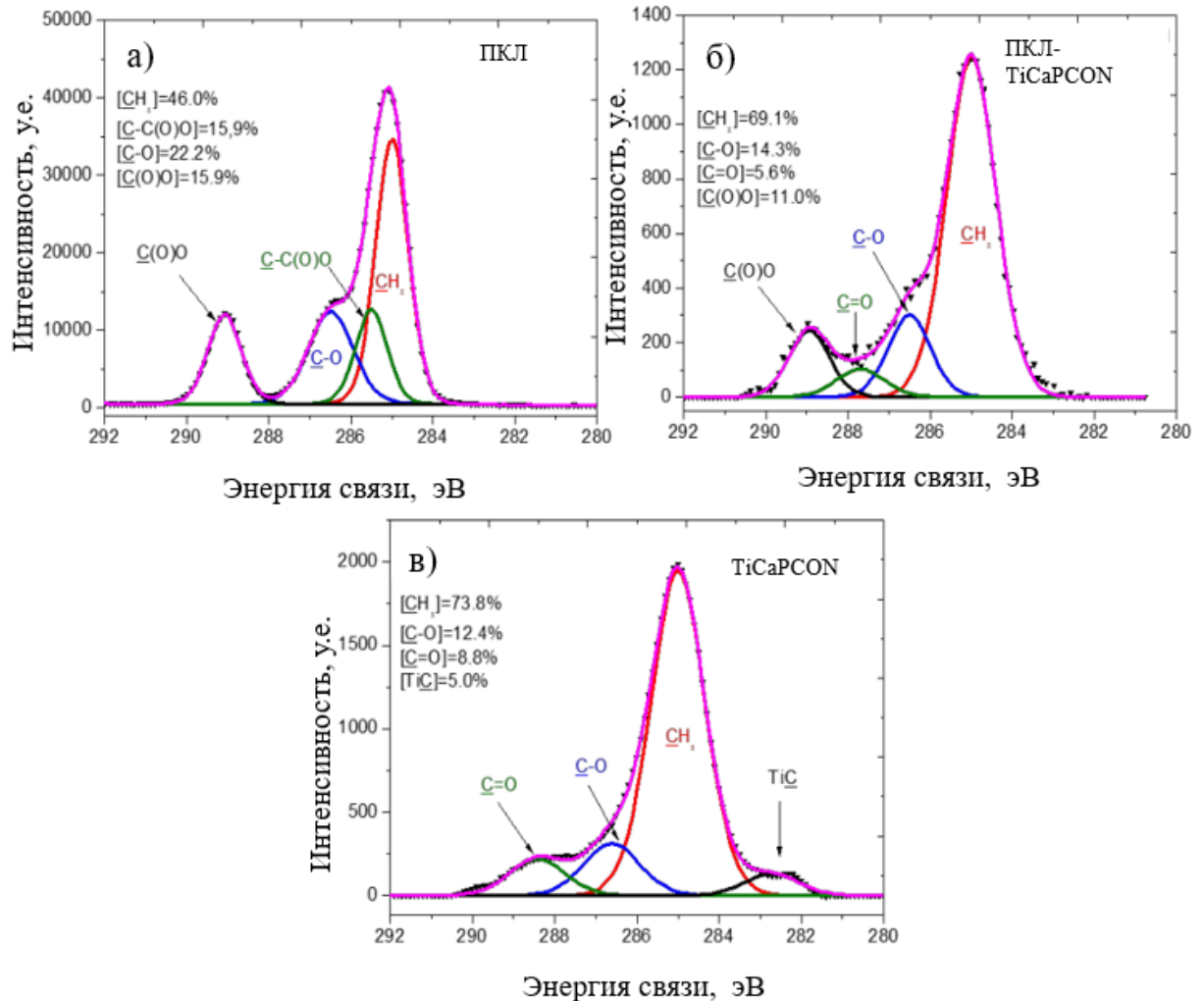


Рисунок 20 – Спектры РФЭС C1s образцов ПКЛ (а), ПКЛ-TiCaPCON (б) и Si-TiCaPCON (в)[203]

Известно, что высокая биологическая активность TiCaPCON и их хорошие механические свойства достигаются благодаря нанокompозитной структуре, содержащей связи TiC, TiN и TiO₂, а также за счет появления функциональных групп на поверхности [236]. Сигнал РФЭС Ti2p от слоя TiCaPCON, нанесенного на нановолокна ПКЛ, показан на Рисунке 21а. Из-за лучшего разрешения сигнала Ti2p_{3/2} по сравнению с Ti2p_{1/2} дальнейший анализ РФЭС проводился с использованием пика Ti 2p 3/2. Пик Ti2p 3/2 был разложен на три компонента (Рисунок 21а): TiC (ЭС = 454.6 эВ, FWHM = 1.3 эВ), TiN (ЭС = 456.1 эВ FWHM = 1.8 эВ) и TiO₂ (ЭС = 457.9 эВ, FWHM = 1.6 эВ). Сигнал Ti 2p 3/2 слоя TiCaPCON, нанесенного на пластину Si (Рисунок 21б), был разложен с использованием тех же трех компонентов: TiC (ЭС = 455.3 эВ, FWHM = 1.2 эВ), TiN (ЭС = 456.6 эВ, FWHM =

1.8 эВ) и TiO_2 (ЭС = 458.5 эВ, FWHM = 1.6 эВ). Хотя РФЭС-спектры пленок TiCaPCON , нанесенных на нановолокна ПКЛ и на кремниевую пластину, показали некоторые различия в соотношениях пиков, основные характеристики всех карбидных, нитридных и оксидных состояний присутствовали в образце ПКЛ- TiCaPCON [203].

Чтобы доказать, что наблюдаемый пик РФЭС Ti 2p при 456.1 эВ принадлежит TiN , пик N1s образца ПКЛ- TiCaPCON (Рисунок 21в) был разложен на две компоненты: TiN (ЭС ~ 397 эВ) и азота, связанного с углеродом CN (ЭС = 399.2 эВ). Пик N1s образца Si- TiCaPCON (Рисунок 21г) потребовал добавления третьего компонента, а именно протонированных аминов NH_3^+ (ЭС = 401.3 эВ). Присутствие NH_3^+ указывает на то, что в образце Si- TiCaPCON некоторая часть азота протонируется за счет влажности в атмосфере. Пленки TiCaPCON , нанесенные на нановолокна ПКЛ и кремниевую пластину, имеют сходную химическую структуру[203].

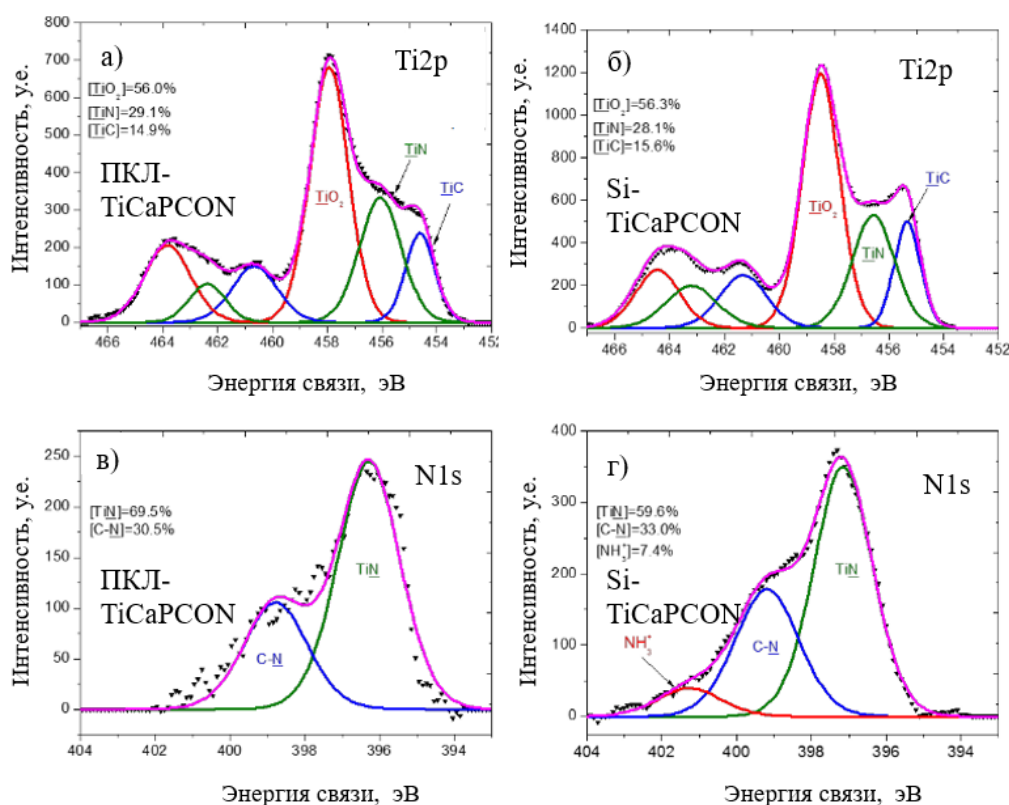


Рисунок 21 – РФЭС спектры Ti2p (а, б) и N1s (в, г) для образцов ПКЛ- TiCaPCON -2А и Si- TiCaPCON , соответственно

Таким образом, пленки TiCaPCON были успешно нанесены на термочувствительные нановолокна из биоразлагаемого поликапролактона (ПКЛ) с использованием магнетронного распыления композитной мишени $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Низкая температура плавления биоразлагаемых субмикронных волокон ПКЛ требовала тщательной оптимизации технологических параметров для достижения высокого качества пленки и

предотвращения разрушения субстрата. СЭМ и РФЭС анализ показал, что оптимальная структура формируется при токе магнетрона 2 А, а химическая структура пленок TiCaPCON, нанесенных на поверхность полимерных нановолокон и Si, была одинаковой. Важно отметить, что осаждение покрытия не вносило существенных изменений в морфологию нановолокон.

3.4 Смачиваемость поверхности покрытий

Смачиваемость является важным параметром для материалов, использующих в регенеративной медицине, т.к. данная характеристика определяет взаимодействие с клетками (адгезию, пролиферацию и др). Смачиваемость поверхности определяется величиной краевого угла смачивания между поверхностью образца и смачивающей жидкостью, при угле меньше 90° материал считается гидрофильным. Плазменное осаждение полимерных пленок, содержащих карбоксильные группы, и напыление биоактивного покрытия TiCaPCON на поверхность волокон ПКЛ существенно повысило гидрофильность разрабатываемых материалов (Рисунок 22). Измерения смачивания методом лежащей капли показали, что образец ПКЛ обладает гидрофобными характеристиками, поскольку угол смачивания составляет приблизительно $134.0 \pm 1.9^\circ$. Осаждение плазменно-осажденного полимерного слоя из смеси газов Ar/CO₂/C₂H₄ привело к снижению угла смачивания до $45.3 \pm 2.1^\circ$. После нанесения пленки TiCaPCON значение угла смачивания составляло $34.1 \pm 1.1^\circ$. Принимая во внимание, что шероховатость образцов ПКЛ, ПКЛ–COOH и ПКЛ–TiCaPCON сильно не отличалась (Рисунок 18,19), улучшение смачиваемости субмикронных волокон ПКЛ можно объяснить наличием на поверхности полярных групп.

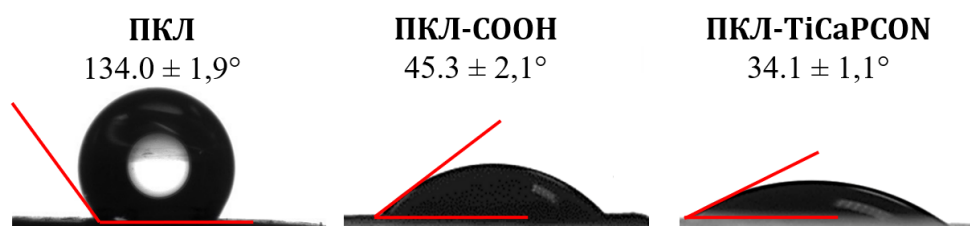


Рисунок 22 – Контактный угол смачивания необработанных волокон (ПКЛ), плазменно-модифицированных волокон (ПКЛ-СООН), ПКЛ, покрытых TiCaPCON

3.5 Сравнение механических характеристик образцов ПКЛ, ПКЛ-СООН и ПКЛ-TiCaPCON

Чистые и поверхностно-модифицированные образцы ПКЛ подвергались одноосному растяжению до разрушения. На Рисунке 23 показаны значения прочности при растяжении испытуемых материалов, определенные по кривым «напряжение-

деформация». Предел прочности при растяжении необработанных нановолоконных мембран из ПКЛ составил 14.1 ± 0.7 МПа, что сопоставимо с другими результатами [237]. Значение модуля Юнга чистого ПКЛ составило 1.6 ± 0.1 МПа, что согласуется с результатами других исследований [238]. Исследование механических свойств нановолокон, подвергнутых плазмо-химической обработке (ПКЛ-СООН), магнетронной обработке (ПКЛ-TiCaPCON) и без обработки (ПКЛ), выявило, что предел прочности при растяжении нановолокон с покрытиями значительно уменьшается по сравнению с необработанными образцами ($\sigma(\text{ПКЛ-СООН})=7.7\pm0.9$ МПа; $\sigma(\text{ПКЛ-TiCaPCON})=5.4\pm1.3$ МПа). Это снижение можно объяснить структурными изменениями, которые происходят на молекулярном уровне во время обработки и могут привести к увеличению количества поперечных связей или разрывов в структуре полимера [239]. При этом плазменное осаждение карбоксил-содержащих полимерных покрытий приводит к незначительному снижению значений относительного удлинения ($\varepsilon=83.1\pm13.6\%$) и модуля Юнга нановолокон ($E=1.3\pm0.2$ МПа), в то время как магнетронное распыление композиционной мишени на поверхность ПКЛ волокон значительно повышает относительное удлинение ($\varepsilon=212.4\pm22.4\%$), но снижает модуль Юнга ($E=1.0\pm0.1$ МПа). Рассчитанные параметры приведены в Таблице 12.

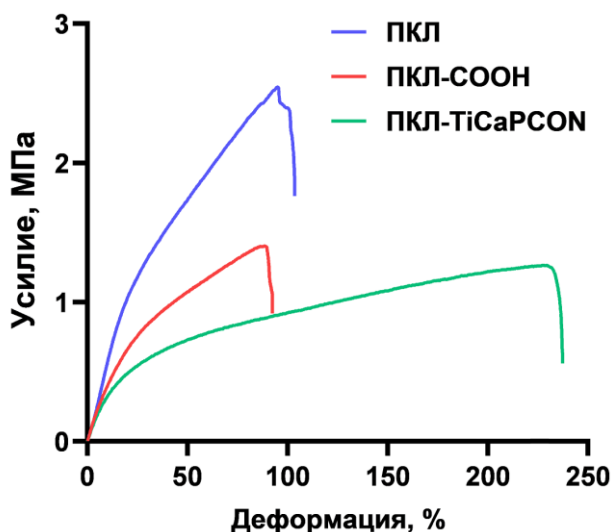


Рисунок 23 – Кривые зависимости подаваемой силы при растяжении от деформации для образцов ПКЛ, ПКЛ-СООН и ПКЛ-TiCaPCON

Таблица 12 – Механические свойства необработанных ПКЛ волокон и волокон с покрытиями (ПКЛ-СООН, ПКЛ-TiCaPCON)

Образец	σ , МПа	ε , %	E , МПа
ПКЛ	14.1 ± 0.7	105.8 ± 3.1	1.6 ± 0.1
ПКЛ-СООН	7.7 ± 0.9	83.1 ± 13.6	1.3 ± 0.2
ПКЛ-TiCaPCON	5.4 ± 1.3	212.4 ± 22.4	1.0 ± 0.1

3.6 Исследование биоактивности образцов ПКЛ, ПКЛ-СООН и ПКЛ-TiCaPCON за счет выдержки в растворе, имитирующем внутреннюю среду организма

Чтобы избежать трудоемких и дорогостоящих экспериментов *in vivo*, биологическую активность материала, в первом приближении, можно оценить в лабораторных условиях *in vitro*. Погружение биоматериалов в раствор, моделирующий внутреннюю среду организма (simulated body fluid, SBF), с концентрацией ионов, близкой к их концентрации в плазме крови человека, и дальнейшее изучение механизмов и кинетики образования костного апатита - широко используемый метод [240].

В данном эксперименте было исследовано два типа образцов покрытий ПКЛ-СООН, полученных методом плазменно-химического осаждения из газовой фазы, и ПКЛ-TiCaPCON, полученных за счет обработки ПКЛ волокон методом магнетронного распыления композиционной мишени состава $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. В качестве контрольных образцов использовались немодифицированные ПКЛ волокна. После экспериментов по минерализации образцы ПКЛ, ПКЛ-TiCaPCON и ПКЛ-СООН были проанализированы с помощью СЭМ, ЭДС, ИК-спектроскопии и РФЭС.

Микрофотографии СЭМ показали, что после погружения в SBF на 24 ч поверхность нановолокон ПКЛ-СООН и ПКЛ-TiCaPCON была плотно покрыта сферическими частицами диаметром 50–100 нм (Рисунок 24). После 14 дней минерализации размер частиц увеличился в два раза, и они покрыли почти всю поверхность нановолокон. Элементный состав образцов после выдержке в SBF определяли с помощью ЭДС. Изменение концентрации Са во времени изображено на Рисунке 25. После погружения в SBF на 3 часа содержание Са в образце ПКЛ-СООН увеличилось до 0.6 ат.% и далее не менялось. На поверхности нановолокна ПКЛ, погруженного в SBF, образования кальция и наночастиц не наблюдали.

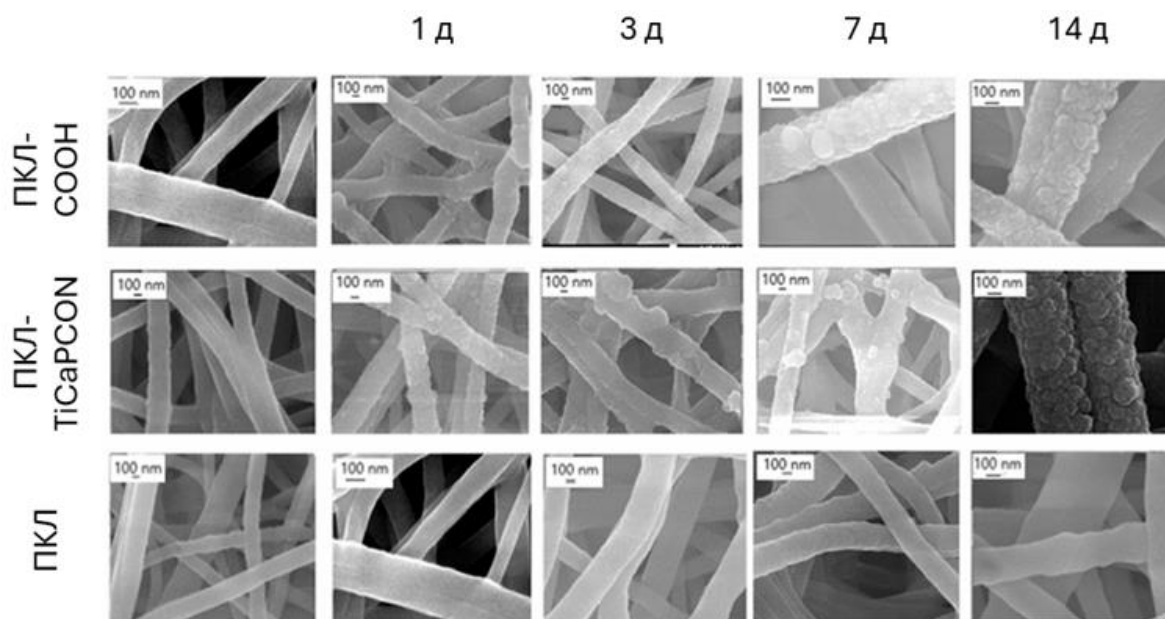


Рисунок 24 – СЭМ изображения нановолокон поли-ε-капролактона (ПКЛ), ПКЛ – СООН и ПКЛ – TiCaPCON до (левый столбец) и после минерализации в течение 1, 3, 7 и 14 дней

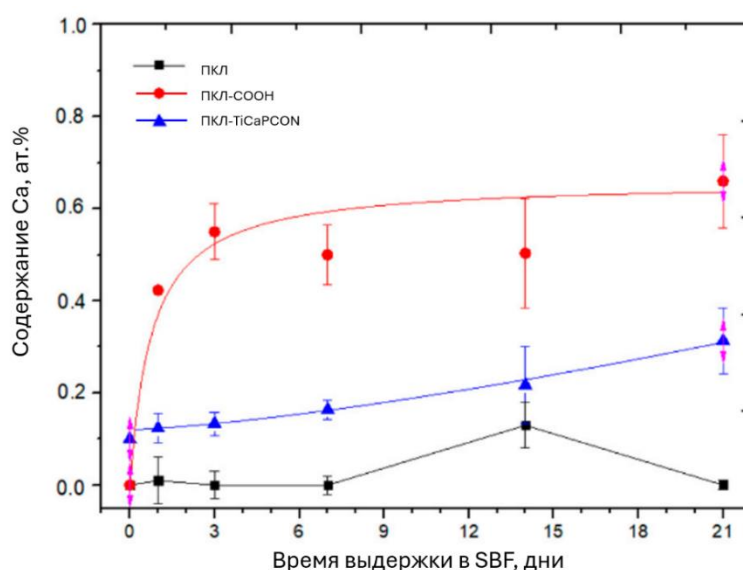


Рисунок 25 – Концентрация Са как функция от времени выдержки в SBF

ИК-спектры ослабленного полного отражения (ATR) образцов ПКЛ, ПКЛ–СООН и ПКЛ–TiCaPCON перед погружением в SBF представлены на Рисунке 26а. Присутствие полимера ПКЛ подтверждается пиками CH_2 , расположенными на значении волнового числа 2945 и 2866 см^{-1} , и полосами отражения C=O , C-O , и CO-O-CO , соответственно расположенных при 1724 , 1175 и 1044 см^{-1} [241]. Высокая оптическая плотность, наблюдаемая в диапазонах $1420\text{--}1400$ и $900\text{--}690\text{ см}^{-1}$, объясняются деформационными

колебаниями CH_2 , CH_3 и CH . Сильные полосы отражения, обусловленные асимметричными и симметричными колебаниями $\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}$, наблюдались в диапазоне волновых чисел $1200-1150\text{ см}^{-1}$ [242]. ИК-спектры образцов после плазменной полимеризации были аналогичны спектрам ПКЛ. В случае нановолокон ПКЛ- COOH этот результат можно объяснить тем, что все химические связи плазменно-осажденного полимера также присутствуют в структуре нановолокон ПКЛ. Отметим, что после обработки плазмой полосы поглощения $\text{C}(=\text{O})-\text{O}$, $\text{C}-\text{O}$ и $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ стали шире, а их интенсивность увеличилась. В ИК-спектрах нановолокон, покрытых TiCaPCON , обнаружен небольшой пик при 501 см^{-1} (Рисунок 26а (вставка)), который можно отнести к связям $\text{Ti}-\text{O}$ [243].

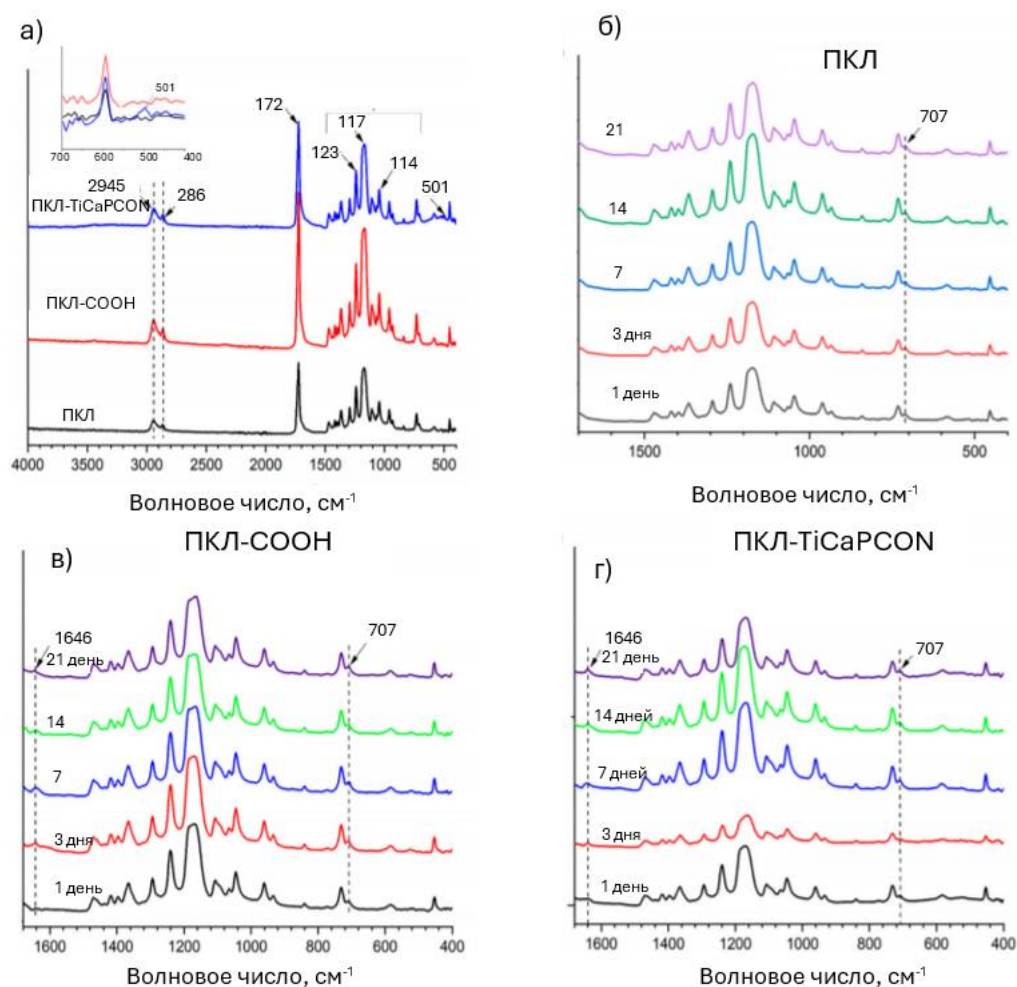


Рисунок 26 – ИК спектры ослабленного полного отражения – преобразования Фурье (ATR – FTIR) ПКЛ, ПКЛ- COOH и ПКЛ – TiCaPCON до (а) и после погружения в среду, имитирующую внутреннюю среду организма (б – г)[221]

На Рисунке 26 б-г сравниваются ИК спектры ПКЛ, ПКЛ- COOH и ПКЛ- TiCaPCON , в диапазоне $400-1600\text{ см}^{-1}$ после погружения в SBF на 1, 3, 7, 14 и 21 день. На ИК спектре ПКЛ пиков, связанных с Ca , не наблюдалось (Рисунок 26б)[221]. Напротив, на ИК спектрах нановолокон ПКЛ- COOH и ПКЛ- TiCaPCON заметны значительные изменения после

погружения в SBF (Рисунок 26б-г). Появление Ca пика при 1646 см^{-1} связано с электростатическим сопряжением Ca в результате реакции между карбоксильной группой COOH и Ca^{2+} . Кроме того, после минерализации нановолокон ПКЛ–COOH и ПКЛ–TiCaPCON наблюдался слабый пик при 707 см^{-1} , соответствующий связи Ca–O [244], и пики при 601 и 564 см^{-1} , относящиеся к фосфат-ионам[221]. Результаты ИК-спектроскопии, описанные выше, были дополнительно подтверждены РФЭС анализом. После погружения в SBF, РФЭС-анализ образца ПКЛ–COOH выявил присутствие кальция (Таблица 13).

Таблица 13 – Содержания различных элементов в образцах, определенный с использованием РФЭС анализа

Образец	(C), ат.%	(O), ат.%	(N), ат.%	(Ca), ат.%	(Na), ат.%	(Ti), ат.%
ПКЛ	76.0	24.0	0	0	0	0
ПКЛ-TiCaPCON	55.4	22.5	8.6	1.1	0	8.4
ПКЛ-COOH	77.0	23.0	0	0	0	0
ПКЛ-COOH-12ч	75.0	22.0	1.1	1.5	0.4	0
ПКЛ-COOH-24ч	77.3	20.1	1	1.2	0.3	0
ПКЛ-COOH-72ч	78.2	18.4	2.4	1	0	0

Для сравнения отметим, что после испытаний в SBF изменений в спектрах РФЭС для образца ПКЛ не происходило, и Ca на его поверхности не обнаружен. Кроме того, в спектрах РФЭС C1s наблюдаются небольшие изменения вкладов C(O)O и C=O, по-видимому, из-за того, что ионы Ca^{2+} координированы с карбоксильными и карбонильными группами слоя ПКЛ–COOH (Рисунок 27 г,д). Учитывая, что концентрация Ca является довольно низкой (~ 1.2 ат.%), а метод РФЭС имеет высокую поверхностную чувствительность, можно предположить, что минерализованный слой либо очень тонкий, либо содержит мало кальция[221].

В заключение отметим, что модификация поверхности ПКЛ также влияет на скорость растворения нановолокон. Было обнаружено, что образцы ПКЛ-TiCaPCON и ПКЛ-COOH полностью растворяются в SBF в течение 30 дней после инкубации. В то же время, только 27% деградации наблюдали для субмикронных волокон ПКЛ с тем же диаметром, что и для образцов ПКЛ-COOH/ПКЛ-TiCaPCON, использованных в работе [245]. Ускоренное растворение нановолокон может быть вызвано интенсивным ионным воздействием во время осаждения пленки TiCaPCON, что приводит к структурным изменениям в структуре ПКЛ скаффолдов. Кроме того, чрезвычайно низкий угол смачивания для ПКЛ-TiCaPCON указывает на высокое сродство молекул воды к

нановолокнам ПКЛ-TiCaPCON, тем самым ускоряя гидролиз гидрофильных скаффолдов ПКЛ-TiCaPCON по сравнению с гидрофобным образцом ПКЛ.

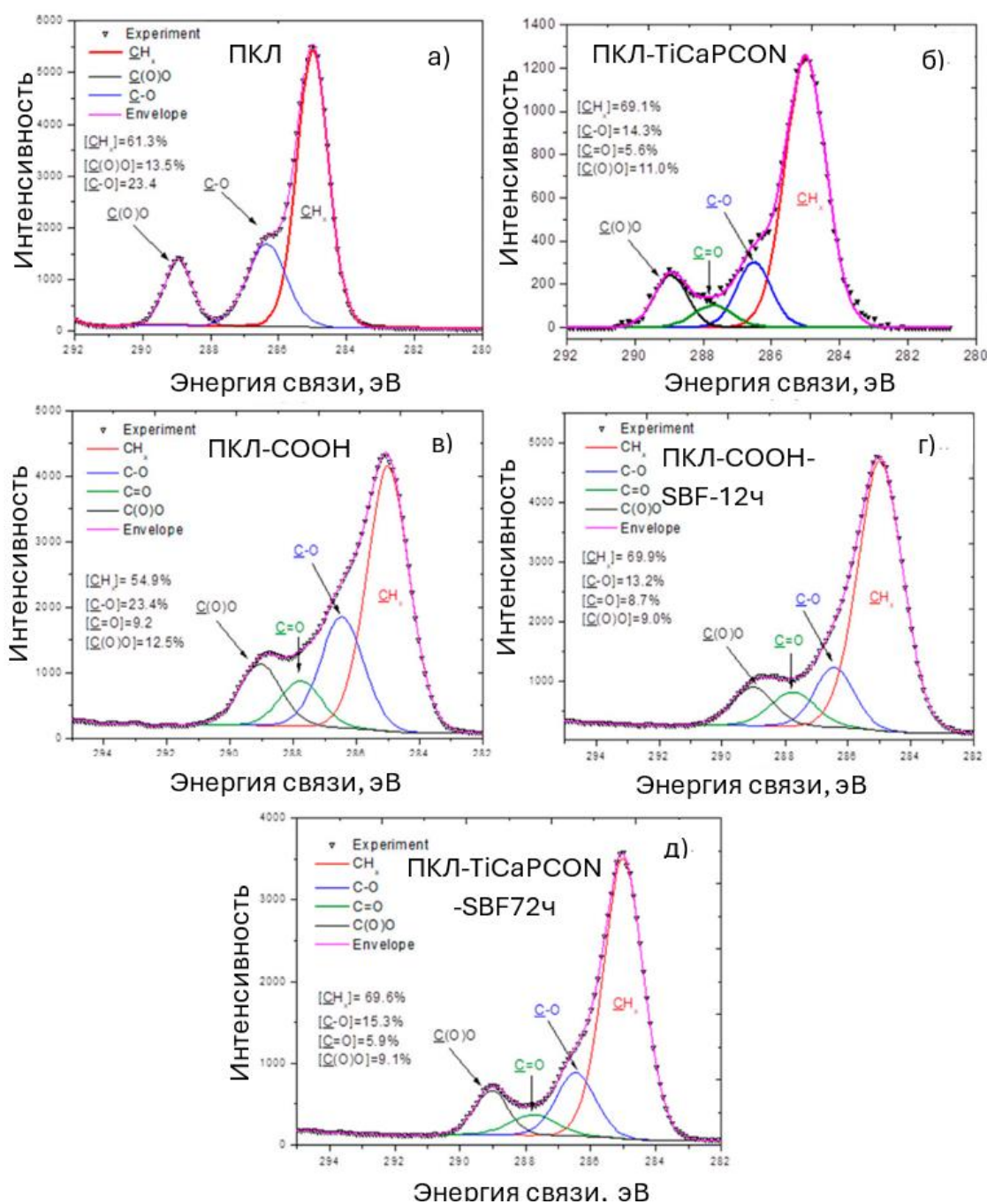


Рисунок 27 – Спектры РФЭС C1s образцов ПКЛ(а), ПКЛ-TiCaPCON(б), ПКЛ-COOH (в), а также образцов ПКЛ-COOH и ПКЛ-TiCaPCON после погружения в раствор, имитирующий внутреннюю среду организма, в течение 12 (г) и 72 ч (д)

3.7 Изучение биоактивности образцов ПКЛ, ПКЛ-COOH и ПКЛ-TiCaPCON по анализу активности щелочной фосфатазы

Для исследования влияния различных способов модифицирования поверхности ПКЛ скаффолдов на их биоактивность, была оценена способность покрытий поддерживать

остеогенную дифференцировку с использованием раннего маркера дифференцировки - щелочной фосфатазы (ЩФ). Проведенные исследования показали, что оба варианта модификации повышают биоактивность ПКЛ скаффолдов и стимулируют остеогенную дифференцировку (Таблица 14)[221].

Таблица 14 – Активность щелочной фосфатазы

Образец	Активность ЩФ, нМ р-нитрофенола /мин/мг белка
ПКЛ	532 ± 42
ПКЛ-TiCaPCON	1005 ± 34
ПКЛ-COОН	1714 ± 92

3.8 Исследование биосовместимости образцов ПКЛ, ПКЛ-COОН и ПКЛ-TiCaPCON

Для того чтобы сравнить адгезивность поверхностно-модифицированных нановолокон ПКЛ к различным типам клеток, прикрепление клеток MC3T3-E1 и IAR-2 изучали с помощью флуоресцентной микроскопии (Рисунок 28а,г). Образец ПКЛ и покровное стекло использовали в качестве контролей. На Рисунке 28в сравнивается средняя площадь клеток IAR-2, культивируемых на поверхности различных субстратов. Полученные результаты показывают, что поверхность всех испытанных нановолокон является адгезивной для клеток IAR-2. Как видно из Рисунка 28в, COОН-модифицированные нановолокна имеют наибольшую площадь клеток (средняя площадь клеток увеличилась на 35% и 20% по сравнению с ПКЛ и ПКЛ-TiCaPCON). Было обнаружено, что клетки IAR-2 хорошо распределены по поверхности всех испытанных образцов. Тесты пролиферации IAR-2 не показали статистически значимой разницы между тестируемыми образцами (Рисунок 28б). Таким образом, нановолокна ПКЛ, ПКЛ-COОН и ПКЛ-TiCaPCON являются цитосовместимыми.

В случае линии клеток остеобластов MC3T3-E1 разница между образцами становится более заметной. Хотя средняя площадь клеток MC3T3-E1, культивируемых на поверхности плазменно-осажденных полимерных покрытий, была меньше по сравнению с биоактивным стеклом (Рисунок 28г), организация актинового цитоскелета была совершенно иной. Образец ПКЛ выявил единичные незрелые сферические клетки и обширные области, не занятые остеобластными клетками. Напротив, изображения флуоресцентного микроскопа, представленные на Рисунке 28е показывают, что клетки MC3T3-E1 хорошо распластываются на поверхности субстратов ПКЛ-COОН и ПКЛ-TiCaPCON. Это указывает на то, что поверхностная модификация нановолокон путем плазменного осаждения полимерного слоя CO₂/C₂H₄ или TiCaPCON покрытия повышает

адгезивность клеток MC3T3-E1.

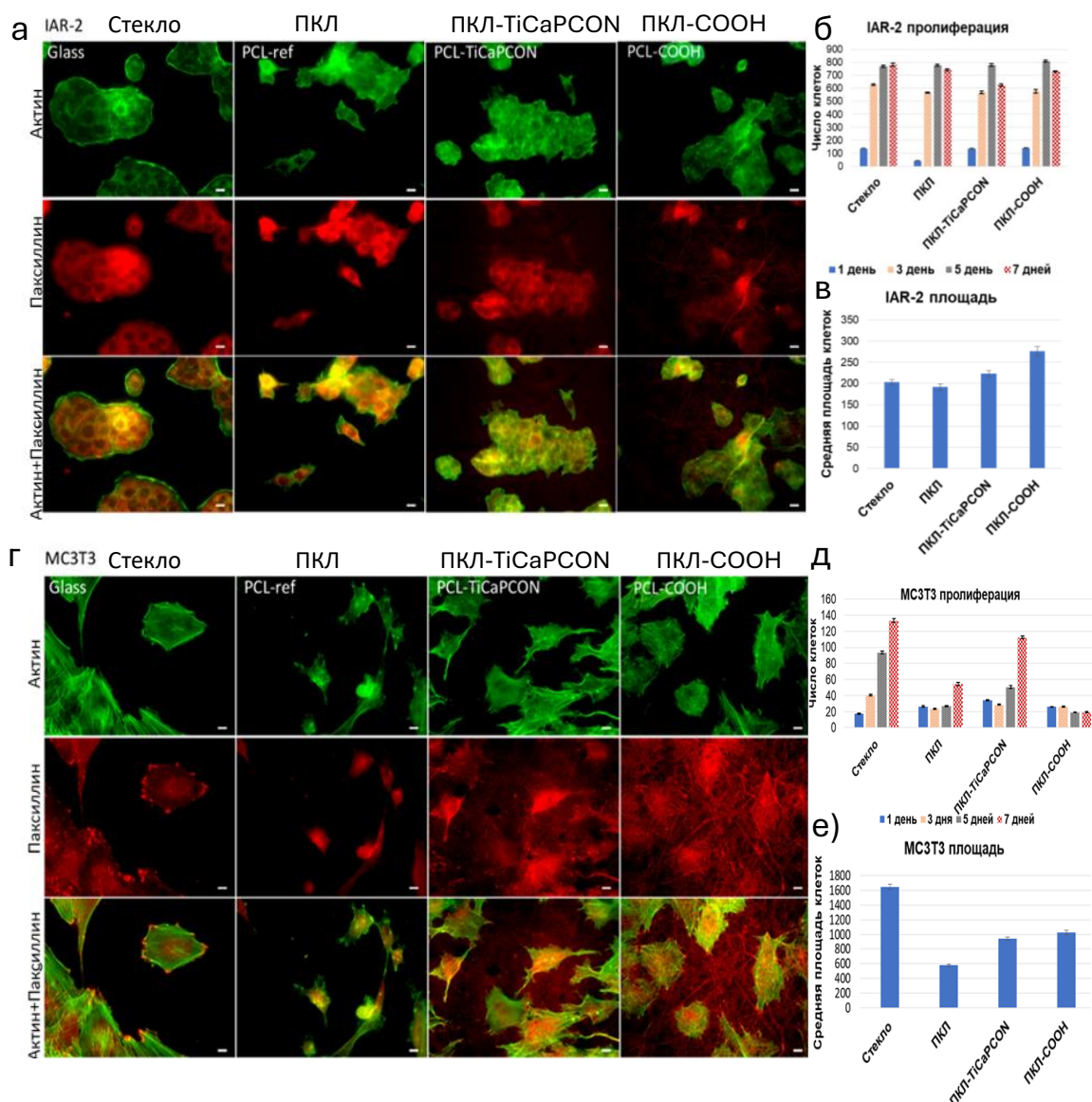


Рисунок 28 – Изображения флуоресцентной микроскопии, показывающие актиновый цитоскелет и фокальные адгезии клеток IAR-2 (а) и MC3T3-E1 (б) на поверхности тестируемых образцов. Окрашивание на актин (зеленый) и паксиллин (красный). Шкала 10 мкм. Пролиферация (б,д) и распластывание (в,е) клеток IAR-2 (б,в) и MC3T3-E1 (д,е) на поверхности тестируемых образцов

Пролиферация клеток MC3T3-E1 на поверхности нановолокон ПКЛ и ПКЛ-COON была ниже по сравнению с контролем (Рисунок 28д). В то же время высокая пролиферация клеток наблюдалась в случае образца ПКЛ – TiCaPCON. Через 7 дней количество клеток на поверхностях нановолокон ПКЛ – TiCaPCON и контроля не было статистически значимым. Подводя итог, отметим, что плазменное осаждение полимерного покрытия с COOH

группами на поверхность нановолокон ПКЛ улучшает адгезию клеток IAR-2, что важно для более быстрого заживления мягких тканей, тогда как осаждение покрытия TiCaPCON способствует лучшей адгезии, распластыванию и пролиферации MC3T3-E1 клеток, что важно для применения в качестве костных наполнителей.

3.9 Выводы по третьей главе

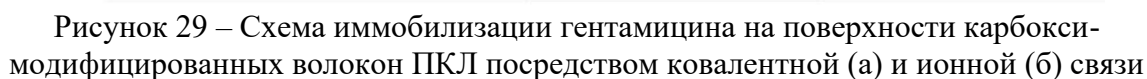
1. Установлены технологические режимы получения электроформованных волокон ПКЛ с диаметром распределения волокон 50-500 нм; микроструктура полученных нетканых материалов имитирует структуру внеклеточного матрикса. Оптимальные режимы электроформования: концентрация ПКЛ в формообразующем растворе из смеси муравьиной и ледяной уксусной кислот составляет 25 вес.%, прикладываемое напряжение 50 кВ, скорость подачи полимерного раствора 0.13 мкл/сек.
2. Разработаны технологические режимы осаждения полимерных покрытий (частота 13.56 МГц, мощность 500 Вт, рабочий цикл 5%, рабочее расстояние 8 см, рабочее давление 4 Па) из газовой смеси $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4/\text{Ar}$. Установлено, что в составе осаждаемых покрытий количество сложноэфирных/карбоксильных групп варьируется в диапазоне 2-12% в зависимости от соотношения потоков реагирующих газов (CO_2 к C_2H_4), при этом вклад реакционноспособных карбоксильных групп составляет 0.1-0.8%. Установлено, что растворение полимерного слоя происходит в результате гидролиза сложноэфирных групп. Скорость гидролиза зависит от кислотности среды, что позволяет контролировать скорость высвобождения лекарственного агента и длительность терапевтического воздействия. Для получения стабильных покрытий с содержанием карбоксильных групп на уровне 0.3% было установлено соотношение потоков реагирующих газов (CO_2 к C_2H_4) как 10.3:16 см³/мин, соответственно. Оптимизированы технологические режимы осаждения при плазменной полимеризации $\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4$ смеси на поверхность ПКЛ волокон с толщиной осаждаемого слоя 30 нм (время обработки 3 мин).
3. Оптимизированы технологические режимы магнетронного распыления композиционной мишени $\text{TiC}+10\%\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ для формирования покрытий на поверхности ПКЛ нановолокон. Установлено, что состав полученного покрытия содержит карбидные, нитридные и оксидные связи титана и аналогичен составу биоактивных покрытий TiCaPCON, используемых для модификации титановых имплантатов.
4. Изучены механические свойства исходных (ПКЛ) и модифицированных ПКЛ волокон: ПКЛ-COON и ПКЛ-TiCaPCON. Показано, что предел прочности (σ)

нановолокон, подвергнутых плазмо-химической обработке (ПКЛ-СООН) и магнетронной обработке (ПКЛ-TiCaPCON) уменьшается по сравнению с необработанными образцами: $\sigma(\text{ПКЛ})=14.1 \pm 0.7$ МПа $\sigma(\text{ПКЛ-СООН})=7.7 \pm 0.9$ МПа; $\sigma(\text{ПКЛ-TiCaPCON})=5.4 \pm 1.3$ МПа). При этом значения относительного удлинения (ϵ) и модуля Юнга (E) для образцов ПКЛ-СООН незначительно снижается, в то время как магнетронное распыление композиционной мишени на поверхность ПКЛ волокон значительно повышает относительное удлинение, но снижает модуль Юнга (ПКЛ: $\epsilon=105.8 \pm 3.1\%$, $E=1.6 \pm 0.1$ МПа; ПКЛ-TiCaPCON: $\epsilon=212.4 \pm 22.4\%$, $E=1.0 \pm 0.1$ МПа; ПКЛ-СООН: $\epsilon=83.1 \pm 13.6$, $E=1.3 \pm 0.2$ МПа)

5. Показано, что модифицированные ПКЛ волокна являются гидрофильными: краевой угол смачивания составляет $45.3 \pm 2.1^\circ$ для ПКЛ-СООН и $34.1 \pm 1.1^\circ$ для ПКЛ-TiCaPCON, тогда, как для исходных ПКЛ волокон он составляет $134.0 \pm 1.9^\circ$.

6. Показана биоактивность волокон ПКЛ-СООН и ПКЛ-TiCaPCON. Биоактивность оценивалась двумя альтернативными методами: 1) путем выдержки в растворе, моделирующем внутреннюю среду организма (SBF) с последующим анализом изменений структуры и химии поверхности, 2) по активности щелочной фосфатазы. Установлено, что при выдержке в SBF на поверхности модифицированных образцов формируются Са-содержащие наночастицы, что свидетельствует о их биоактивности. Активность щелочной фосфатазы выросла в 2 раза для ПКЛ-TiCaPCON и в 3 раза для ПКЛ-СООН по сравнению с необработанными ПКЛ волокнами.

7. Показана высокая биосовместимость модифицированных волокон: ПКЛ-СООН волокна обладают высокой адгезией и большой площадью распластывания эпителиальных клеток, что способствует регенерации мягких тканей, в то время ПКЛ-TiCaPCON волокна проявляют высокую адгезию и стимулируют пролиферацию остеобластных клеток, что демонстрирует потенциал применения в костной регенерации. Модифицированные волокна не оказывают цитотоксического эффекта в отношении обеих тестируемых линий клеток.



Для оценки влияния процесса иммобилизации гентамицина на морфологические характеристики исследуемых образцов был проведен СЭМ анализ. Полученные изображения поверхности образцов до и после связывания антибиотика были подвергнуты сравнительному анализу. Было показано, что внешний вид и структура поверхности материала остаются практически неизменными после иммобилизации гентамицина. Не было выявлено выраженных признаков разрушения, деформации или агрегации структурных элементов материала. Микрорельеф поверхности, включая пористость и распределение поверхностных неоднородностей, сохранялся на уровне контрольных образцов без нанесенного антибиотика (Рисунок 30).

Отсутствие существенных морфологических изменений позволяет предположить, что используемый метод иммобилизации является щадящим и не нарушает физическую целостность материала. Это может свидетельствовать о том, что связывание гентамицина происходит преимущественно на молекулярном уровне — например, за счет адсорбции или химического взаимодействия с функциональными группами поверхности — без значительного влияния на её топографию.

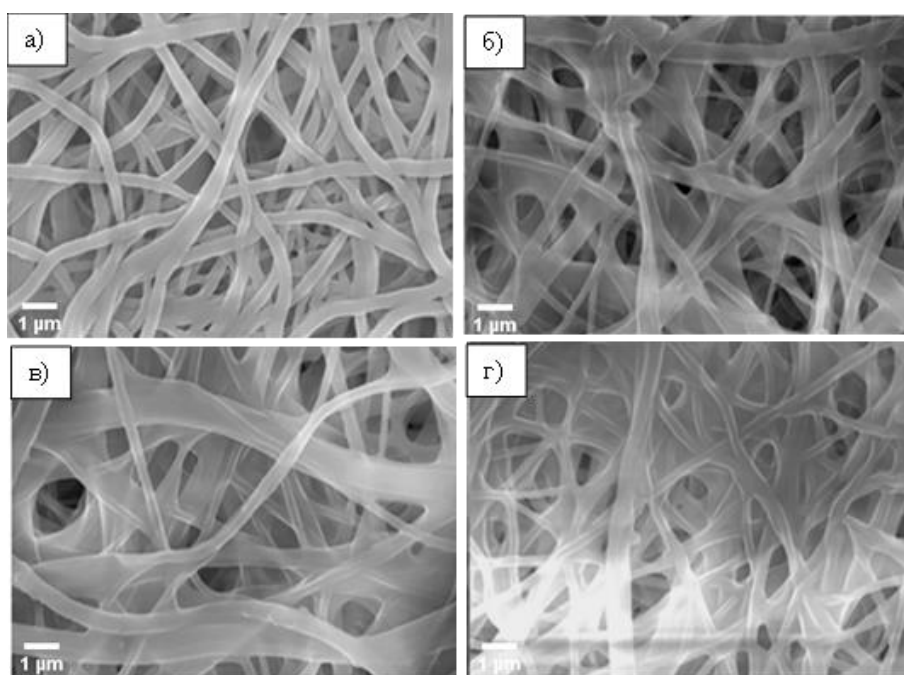


Рисунок 30 - СЭМ-микрофотографии нановолокон из поликапролактона: ПКЛ (а); ПКЛ-СООН (б); ПКЛ-ГМ_{ков} (в); и ПКЛ-ГМ_{ион} (г). Шкала соответствует 1 мкм[244]

На Рисунке 31 сравниваются ИК-спектры образцов ПКЛ, ПКЛ-СООН, ПКЛ-ГМ_{ков} и ПКЛ-ГМ_{ион}. Пик, соответствующий сложноэфирным/карбоксильным группам на значении волнового числа 1734 см^{-1} , четко виден в спектре ПКЛ-СООН, что указывает на присутствие реакционноспособных групп. Введение антибиотика ГМ привело к

формированию амидной связи. Кроме того, можно отметить наличие сульфатного пика, который в качестве противоиона также присутствует на поверхности образцов.

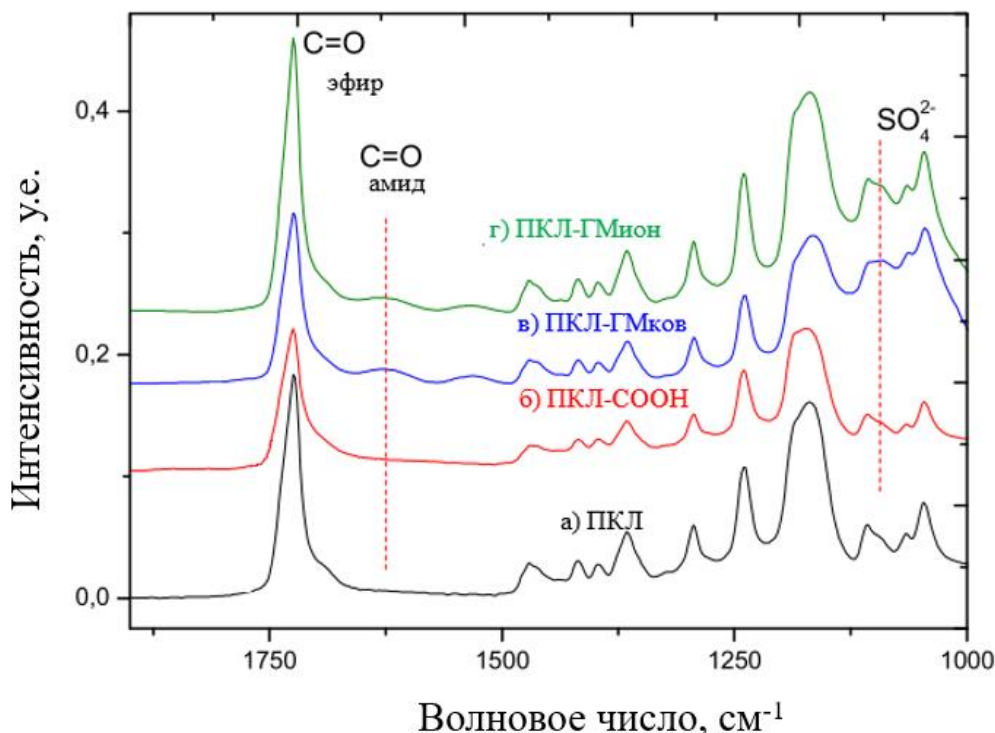


Рисунок 31 – ИК-спектры для образцов ПКЛ (а), ПКЛ-СООН (б), ПКЛ-ГМ_{ков} (в), ПКЛ-ГМ_{ион} (г)

Результаты РФЭС анализа, представленные в Таблице 15, свидетельствуют об отсутствии антибиотика на поверхности образца ПКЛ после его выдержки в растворе гентамицина, поскольку наличие азота в составе образца не обнаружено. Напротив, погружение плазменно-обработанных ПКЛ-СООН в раствор гентамицина приводит к значительному изменению состава поверхности и, как следствие, структуры спектра РФЭС C1s. В образцах ПКЛ-ГМ_{ион} и ПКЛ-ГМ_{ков} содержание азота соответственно составляло 3.2 и 4.6 ат.% (Таблица 15). Наличие серы в виде сульфата (S2p, ЭС = 168.4 эВ) подтвердило, что часть ГМ находится в протонированной форме с сульфатным противоионом. Стоит отметить, что поскольку химическая формула чистого ГМ содержит 15 ат.% [N], обнаруженное количество азота соответствует покрытию примерно 30% поверхности гентамицином.

Таблица 15 – Атомный состав образцов, определенный методом РФЭС

Образцы	Описание	Концентрация, ат.%			
		[C]	[N]	[O]	[S]
ПКЛ	немодифицированные ПКЛ скаффолды	76.4	0.0	23.6	0.0
ПКЛ-СООН	плазменно-обработанные ПКЛ скаффолды	72.4	0.0	27.6	0.0
Образцы	Описание	Концентрация, ат.%			
		[C]	[N]	[O]	[S]
ПКЛ-ГМ _{ков}	ПКЛ-СООН после инкубации с ДЦК и ГМ	72.2	4.6	22	1.2
ПКЛ-ГМ _{ков} -1	ПКЛ-ГМ _{ков} после выдержки в воде в течение 1 ч	74.7	2.3	22.8	0.2
ПКЛ-ГМ _{ков} -24	ПКЛ-ГМ _{ков} после выдержки в воде в течение 24 ч	77.7	2.6	19.6	0.1
ПКЛ-ГМ _{ков} -48	ПКЛ-ГМ _{ков} после выдержки в воде в течение 48 ч	75.6	1.7	22.5	0.2
ПКЛ-ГМ _{ион}	ПКЛ-СООН после инкубации с ГМ	73.9	3.2	22.0	0.9
ПКЛ-ГМ _{ион} -1	ПКЛ-ГМ _{ион} после выдержки в воде в течение 1 ч	74.9	2.9	21.9	0.3
ПКЛ-ГМ _{ион} -24	ПКЛ-ГМ _{ков} после выдержки в воде в течение 24 ч	74.5	3.0	22.3	0.2
ПКЛ-ГМ _{ион} -48	ПКЛ-ГМ _{ков} после выдержки в воде в течение 48 ч	77.5	2.4	19.9	0.2

Для детального анализа механизма взаимодействия гентамицина с поверхностью плазменно-модифицированных нановолокон, C1s и N1s РФЭС спектры образцов были разложены на компоненты. Также было изучено изменение химического состава поверхности после выдержки в воде в течение 1, 24 и 48 ч. Пики РФЭС C1s образцов ПКЛ-ГМ_{ков} (Рисунок 32в) и ПКЛ-ГМ_{ион} (Рисунок 32е) были разложены на четыре углеродные компоненты, как было описано выше для нановолокон ПКЛ-СООН, что также соответствовало разложению, использованному в работе[244].

РФЭС анализ выявил заметные изменения в углеродной среде после иммобилизации ГМ (Рисунок 32 в, е). Содержание эфирных и карбоксильных групп $\underline{\text{C}}(\text{O})\text{O}$ снизилось, тогда как содержание амидов ($\underline{\text{C}}=\text{O} / \text{N}-\text{C}=\text{O}$, ЭС = 287.8 эВ), наоборот, увеличилось (Таблица 16).

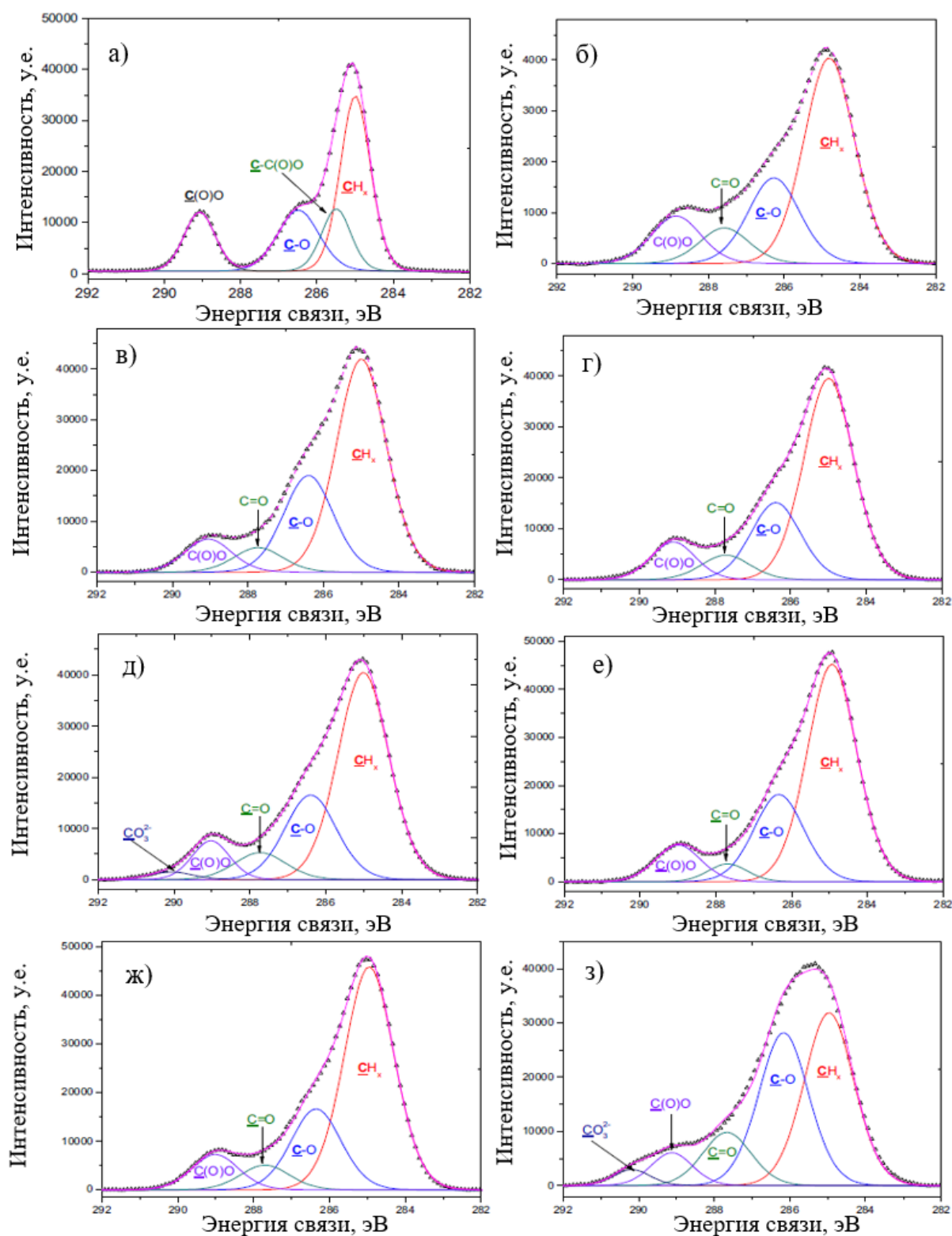


Рисунок 32 – Спектры РФЭС C1s образцов ПКЛ (а), ПКЛ-СООН (б), ПКЛ-ГМ_{ков} (в), ПКЛ-ГМ_{ков} после погружения в воду на 1 ч (г) и 48 ч (д), ПКЛ-ГМ_{ион} (е) ПКЛ-ГМ_{ион} после погружения в воду на 1 ч (ж) и 48 ч (з)

Таблица 16 – Различные углеродные состояния, оцененные из спектра C1s

Образцы	Энергия связи, эВ				
	285.0	286.5	287.8	289.1	290.1
	Концентрации, %				
	CH _x	C-O	C=O/N-C=O	C(O)O	CO ₃ ²⁻
ПКЛ-СООН	55.0	23.3	9.3	12.4	0.0
ПКЛ-ГМ _{ков}	58.5	26.5	6.5	8.5	0.0
ПКЛ-ГМ _{ков} -1	59.9	23.0	7.1	10.0	0.0
ПКЛ-ГМ _{ков} -48	58.4	24.1	7.7	8.0	1.9
ПКЛ-ГМ _{ион}	61.6	25.0	4.0	9.4	0.0
ПКЛ-ГМ _{ион} -1	61.8	22.4	6.7	9.1	0.0
ПКЛ-ГМ _{ион} -48	41.5	36.6	12.5	6.7	2.9

Чтобы лучше понять характер иммобилизации ГМ и химическое состояние азота, сигнал РФЭС N1s был разложен на три компоненты: аминная группа NH₂ (ЭС = 399.1 ± 0.1 эВ), амидная группа N –C=O (ЭС = 400.3 ± 0.1 эВ) и протонированные амины NH₃⁺ (ЭС = 401.7 эВ ± 0.2 эВ). Разложение спектров РФЭС N1s показано на Рисунке 33, а концентрации всех азотных компонентов приведены в Таблице 17. В случае образца ПКЛ-ГМ_{ков} между ГМ и плазменно-модифицированными нановолокнами формируются амидные связи в количестве [N-C=O] = 36%. Присутствие амидных связей в нановолокнах ПКЛ-ГМ_{ков} было также подтверждено соответствующим ИК спектром, представленном на Рисунке 31. В то же время в образце ПКЛ-ГМ_{ион} (Рисунок 33 г) наблюдались только амины на спектре РФЭС N1s: протонированные и непротонированные.

Чтобы исследовать стабильность связи между ГМ и плазменно-осажденным полимерным покрытием CO₂/C₂H₄, образцы погружали в воду при 37 °С на 1, 24 и 48 ч. Анализ РФЭС показал, что атомный состав образцов ПКЛ-ГМ_{ков} и ПКЛ-ГМ_{ион} изменился в течение 1 часа после погружения (Таблица 17). Результаты показали, что концентрация серы резко снизилась за счет растворения группы SO₃H с поверхности. Это привело к уменьшению количества протонированных аминов, что также подтверждается результатами разложения спектра РФЭС N1s (Рисунок 33 б,д). Концентрация азота также значительно снизилась для образца ПКЛ-ГМ_{ков}, тогда как нановолокна ПКЛ-ГМ_{ион} показали почти то же самое количество [N].

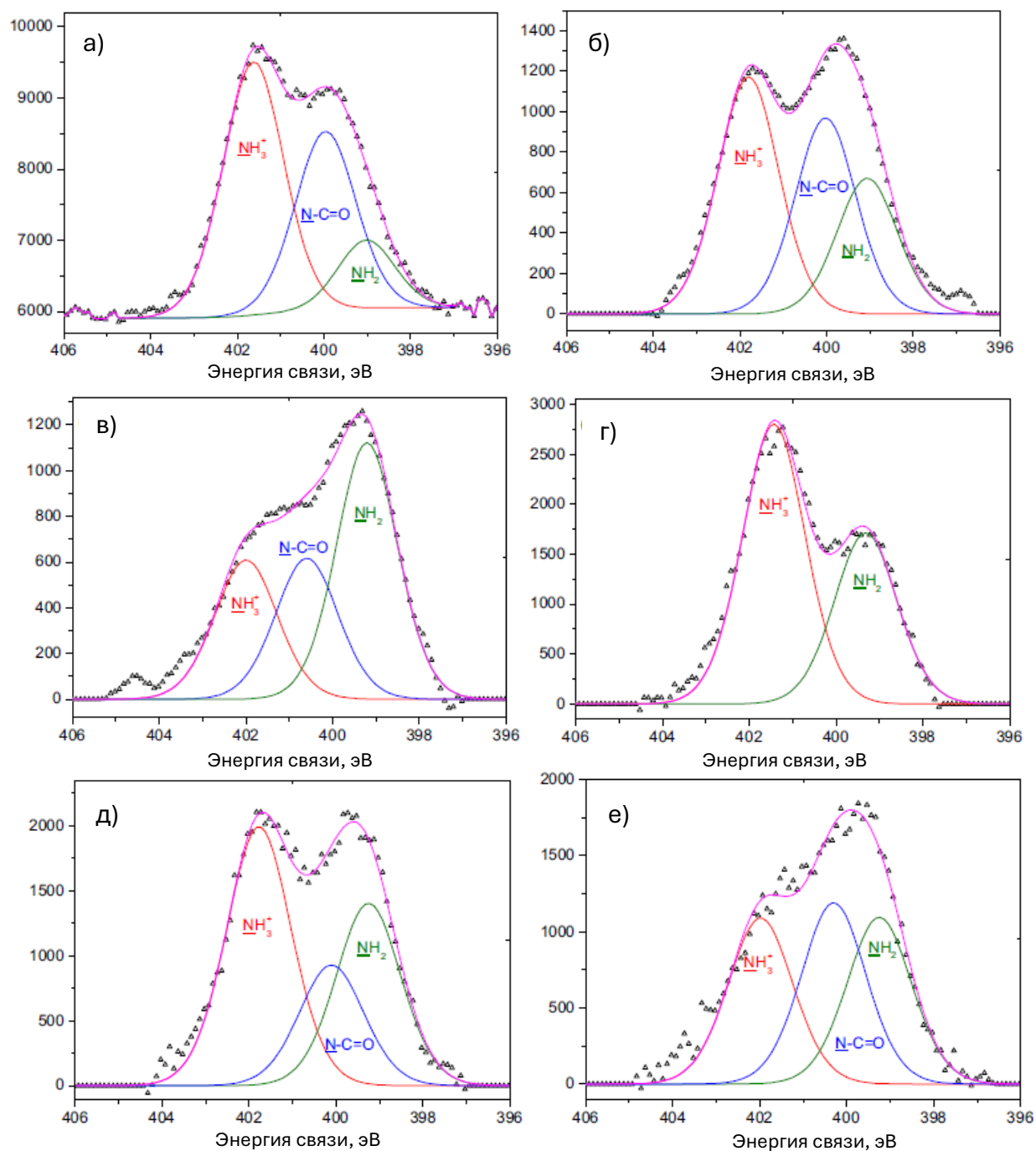


Рисунок 33 – Спектры РФЭС N1s для образцов ПКЛ-ГМ_{КОВ} (а), ПКЛ-ГМ_{КОВ} после погружения в воду на 1 ч (б) и 48 ч (в), ПКЛ-ГМ_{ИОН} (г), ПКЛ-ГМ_{ИОН} после погружения в воду на 1 ч (д) и 48 ч (е)

Таблица 17 – Различные состояния азота, оцененные из спектра РФЭС N1s.

Образец	Концентрации, %			Образец	Концентрация, %		
	NH ₃ ⁺	N-C=O	NH ₂		NH ₃ ⁺	N-C=O	NH ₂
ПКЛ-ГМ _{КОВ}	51	36	13	ПКЛ-ГМ _{ИОН}	62	0	38
ПКЛ-ГМ _{КОВ} -1	42	34	24	ПКЛ-ГМ _{ИОН} -1	46	33	21
ПКЛ-ГМ _{КОВ} -48	26	27	47	ПКЛ-ГМ _{ИОН} -48	32	35	33

Стоит отметить, что спектры РФЭС C1s образцов ПКЛ-ГМ_{ков} до и после выдержки в воде были похожи (Рисунок 32). Это свидетельствует о незначительных изменениях в составе углеродной составляющей (Таблица 16). Нановолокна ПКЛ-ГМ_{ион} показали увеличение содержания C=O/N–C=O на 2,7% за счет компоненты C–O, вызванного образованием амидной связи. Это было также подтверждено разложением спектра РФЭС N1s (Рисунок 33) [244]. Образец ПКЛ-ГМ_{ион} после выдержки в воде в течение 1 ч содержал [N–C=O] = 33%. Как видно из Рисунка 33 и Таблицы 17, азотные среды поверхности обоих образцов (ПКЛ-ГМ_{ион} и ПКЛ-ГМ_{ков}) после выдержки в воде были аналогичны [244]. Таким образом, можно сделать вывод о том, что после смывания всего слабосвязанного ГМ и после возможной температурно-активируемой реакции между ангидридными группами и ГМ при 37 °C обе поверхности окончательно приобретают одинаковый состав.

Интересным результатом, который требует дополнительного обсуждения, является появление пика амида N–C=O даже в образце ПКЛ-ГМ_{ион}. Возникает вопрос, почему образовалась амидная связь даже без активации ДЦК и почему это произошло после инкубации в воде при 37 °C в течение 1 ч, а не сразу на стадии иммобилизации. Скорее всего, образование амидной связи во время инкубации ПКЛ-СООН в растворе сульфата ГМ тормозилось протонированными первичными аминогруппами и низкой температурой. Действительно, хотя реакционноспособные ангидридные группы наблюдались на поверхности ПКЛ-СООН, они, по-видимому, не вступали в реакцию с протонированными амино-группами ГМ. После удаления сульфатных групп SO₃H, первичные аминогруппы, адсорбированные на поверхности ПКЛ-СООН, получили возможность вступить в химическую реакцию с оставшимися ангидридами группами, особенно при повышенных температурах. Эта реакция может быть возможной из-за очень медленного гидролиза циклических ангидридных групп по сравнению со скоростью депротонирования аминов.

Чтобы подтвердить, что ГМ оставался на поверхности нановолокон ПКЛ, ПКЛ-ГМ_{ион} и ПКЛ-ГМ_{ков} в течение относительно длительного периода времени, был проведен дополнительный анализ спектров РФЭС после погружения образца в воду при 37 °C на 48 ч. Согласно результатам, представленным в Таблице 15, концентрация азота [N] оставалась на достаточно высоком уровне (1,7–2,4 ат.%) даже после 48 часов погружения, независимо от процесса иммобилизации. Хотя уменьшение содержания [N] от времени свидетельствует о постепенном растворении ГМ, высокие концентрации N–C=O и NH₂ подтверждают сохранение значительного количества ГМ на поверхности (Рисунки 33 в, е).

Кроме того, погружение в воду на 48 часов приводило к дальнейшему снижению протонированной формы амина (NH₃⁺) и к увеличению концентрации NH₂

пропорционально [N]. Следовательно, иммобилизация ГМ на плазменно-модифицированных скаффолдах может реализоваться двумя различными способами, каждый из которых обеспечивает сохранение препарата на поверхности образцов в течение не менее 2 дней.

4.1.2 Кинетика высвобождения антибиотика гентамицина из гентамицин-модифицированных ПКЛ волокон

Рисунок 34 иллюстрирует кинетику высвобождения антибиотика в раствор ФСБ с течением времени. Количество высвободившегося антибиотика с поверхности образца в единицу времени зависит от способа введения гентамицина в состав ПКЛ скаффолдов. Иммобилизация гентамицина непосредственно на ПКЛ-СООН (без активатора ДЦК) приводит к электростатическому связыванию ГМ с ПКЛ-СООН, как показано на Рисунке 29б. Избыток препарата в растворе позволяет всем свободным группам на поверхности ПКЛ-СООН участвовать в присоединении антибиотика. Активация групп СООН с помощью ДЦК приводит к присоединению объемных фрагментов, содержащих карбодиимид (Рисунок 29а). Скорее всего, эти группы занимают больше места на поверхности во время взаимодействия, по сравнению с амино-группой гентамицина, и пространственно перекрывают часть реакционно-способных карбоксильных групп. В результате загрузка гентамицина в образце ПКЛ-ГМ_{ион} выше, чем на ПКЛ-ГМ_{ков}. Более слабая электростатическая связь антибиотика с подложкой приводит к быстрому высвобождению биоактивных молекул, оставляя поверхность неактивной. Несмотря на разную концентрацию антибиотика, все образцы демонстрируют высокий выход ГМ в течение 1 дня. В случае электростатического связывания выход препарата существенно замедляется через 1 день. Тогда как ковалентно-связанный ГМ продолжает активно выходить до 72 ч (Рисунок 34).

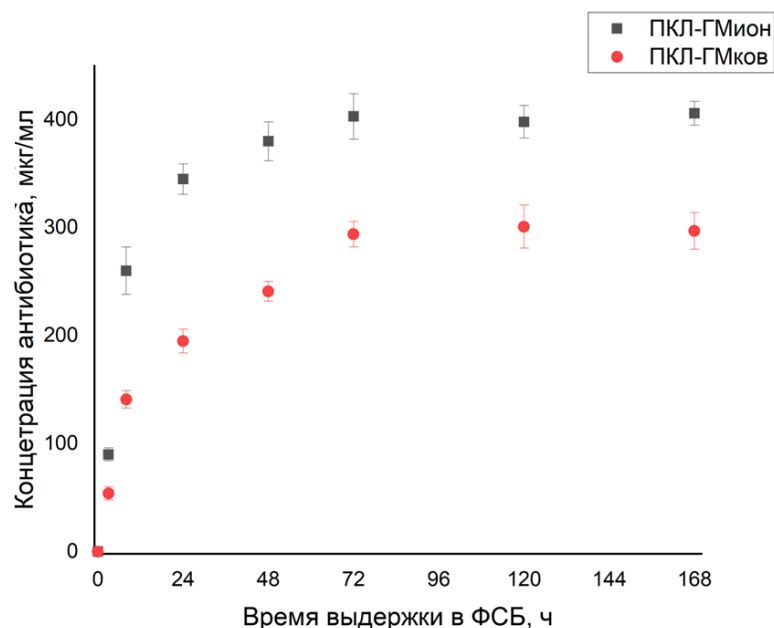


Рисунок 34 – Кинетика выхода антибиотика гентамицина из ПКЛ-ГМ_{ков} и ПКЛ-ГМ_{ион}

В течение первых 24 ч количество высвобождаемого гентамицина составило 345 ± 15 (ПКЛ-ГМ_{ион}) и 195 ± 11 (ПКЛ-ГМ_{ков}) мкг/мл. Через 48 ч количество ГМ, высвободившегося из образца ПКЛ-ГМ_{ион} фактически не меняется и составляет 380 ± 20 мкг/мл, в то время как образец ПКЛ-ГМ_{ков} наблюдается медленное, но стабильное увеличение концентрации антибиотика в течение 3 дней, достигая значения 294 ± 12 мкг/мл. Описанные выше результаты указывают на то, что плазменно-модифицированные образцы обладают высокой способностью загружать антибиотики. В зависимости от типа связи, можно регулировать количество присоединенного к поверхности антибиотика и скорость его выхода. Ковалентное введение антибиотика обеспечивает более равномерный выход препарата на протяжении 3 дней.

4.1.3 Антибактериальная активность гентамицин-модифицированных ПКЛ волокон

Антибактериальная активность гентамицин-модифицированных волокон была изучена с использованием агар-диффузионного теста. В случае антибактериального эффекта вымывание ГМ из образцов ПКЛ-ГМ_{ков} и ПКЛ-ГМ_{ион} должно привести к образованию зоны бактериального подавления. Нановолокна без иммобилизованного ГМ не проявляют какой-либо заметной антибактериальной активности против всех трех типов бактерии кишечной палочки, а именно К-19, К-41 и К-261 (Рисунок 35). Размер зоны ингибирования вокруг образцов ПКЛ-ГМ_{ион} и ПКЛ-ГМ_{ков} достигал 27 мм (Рисунок 36а), что указывает на сильный антибактериальный эффект против всех типов бактерий *E. coli*.

Нановолокна ПКЛ-ГМ_{ион} соответственно имели зону подавления 28, 16 и 22 мм в отношении *E.coli* K-19, K-41 и K-261 (Рисунок 36б). Аналогичные значения были получены для образца ПКЛ-ГМ_{ков} (Рисунок 36в). Размер зон подавления хорошо коррелирует с бактериальной устойчивостью к гентамицину по данным МИК ГМ.

Чтобы изучить продолжительность антибактериального эффекта, нановолокна ПКЛ-ГМ_{ков} и ПКЛ-ГМ_{ион} погружали в стерильный физиологический раствор (NaCl, 9 г/л) при 37 °С на 24 и 48 ч, а затем исследовали диффузию ГМ в агар. Было обнаружено, что после 24 ч инкубации скаффолды ПКЛ-ГМ_{ков} и ПКЛ-ГМ_{ион} проявляют антибактериальную активность только против низкоустойчивых штаммов *E.coli* K-19 (Рисунок 35б,в) [244]. После инкубации образца ПКЛ-ГМ_{ков} в течение 48 часов небольшой антибактериальный эффект также наблюдался в отношении *E.coli* K-19.

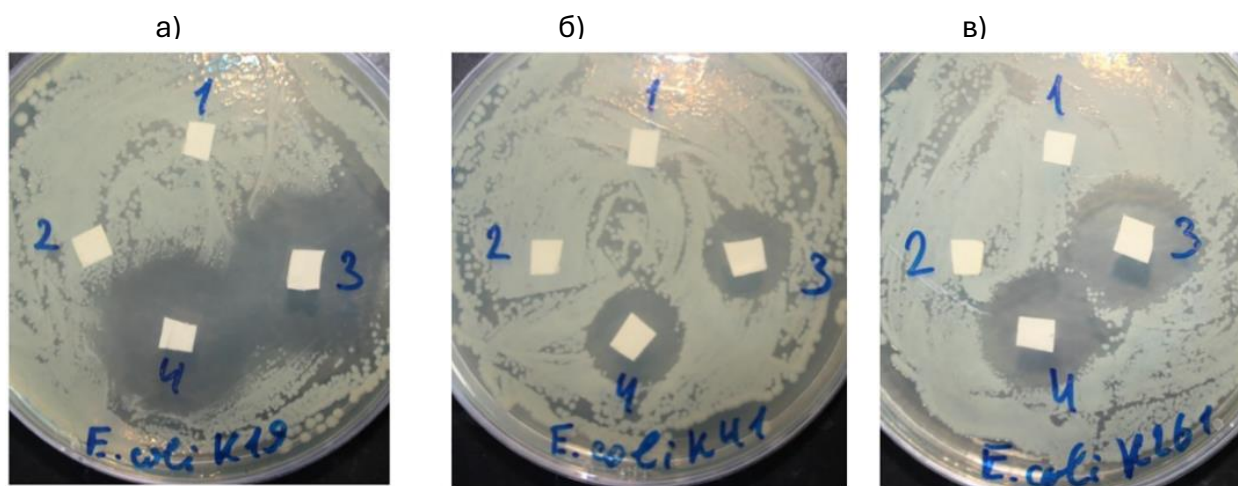


Рисунок 35 – Зона ингибирования бактерий *E. coli* K-19 (а), K-41 (б) и K-261 (в) вокруг образцов после выдержки 24 ч. 1 - ПКЛ, 2 – ПКЛ-СООН, 3 – ПКЛ-ГМ_{ион} и 4 – ПКЛ-ГМ_{ков}.

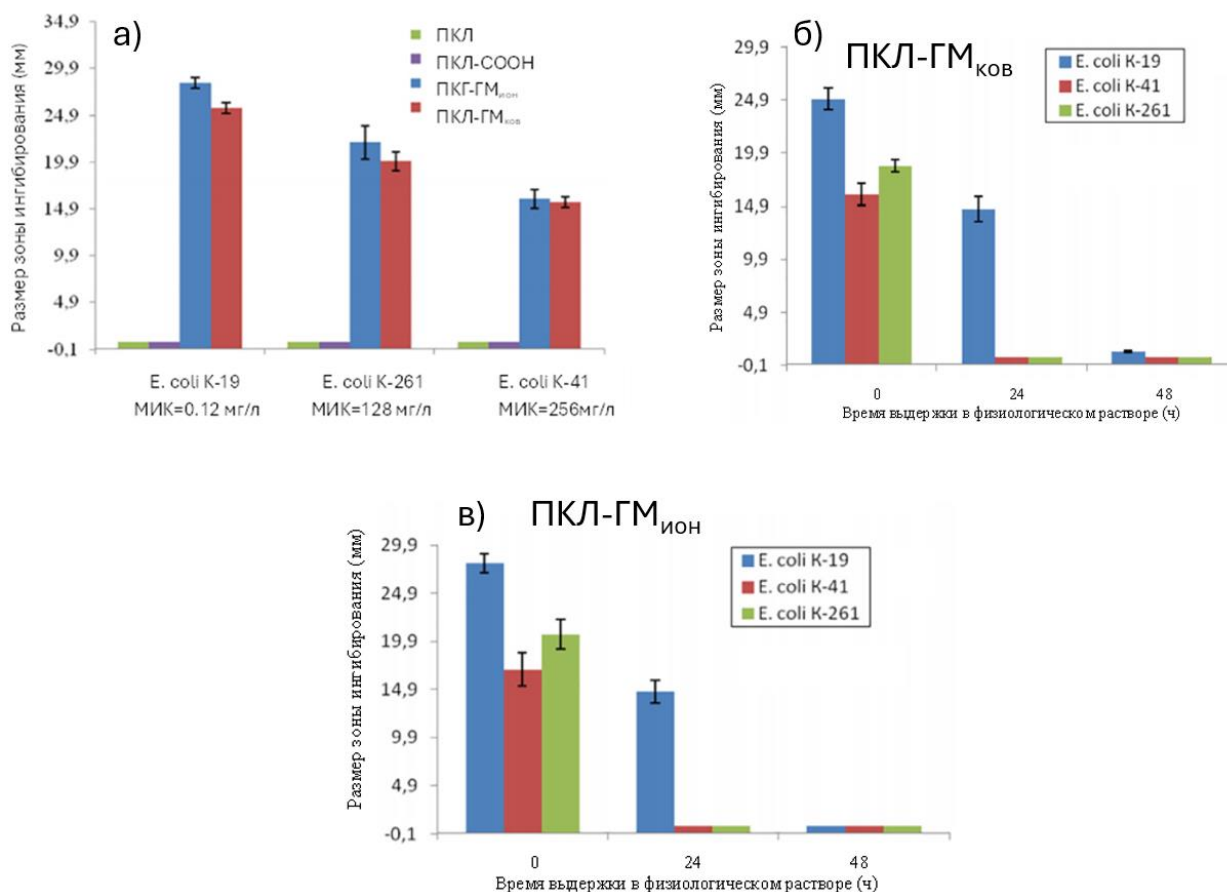


Рисунок 36 – Размер зон ингибирования образцов ПКЛ, ПКЛ-СООН, ПКЛ-ГМ_{ион} и ПКЛ-ГМ_{ков} относительно штаммов E.coli с различной устойчивостью к антибиотику ГМ (а). Размер зон ингибирования вокруг образцов ПКЛ-ГМ_{ков} (б) и ПКЛ-ГМ_{ион} (в) в различных бактериальных суспензиях в зависимости от времени инкубации

4.1.4 Биосовместимость гентамицин-модифицированных ПКЛ волокон

Сравнительные исследования адгезии эпителиальных клеток IAR-2 на поверхности ПКЛ и поверхностно-модифицированных ПКЛ-СООН, ПКЛ-ГМ_{ков} и ПКЛ-ГМ_{ион} были выполнены в качестве первой стадии оценки биосовместимости материалов[244].

Из анализа флуоресцентных изображений становится ясно, что образец ПКЛ был менее адгезивным для эпителиальных клеток IAR-2. Клетки плохо распластывались на поверхности ПКЛ и имели округлую форму (Рисунок 37).

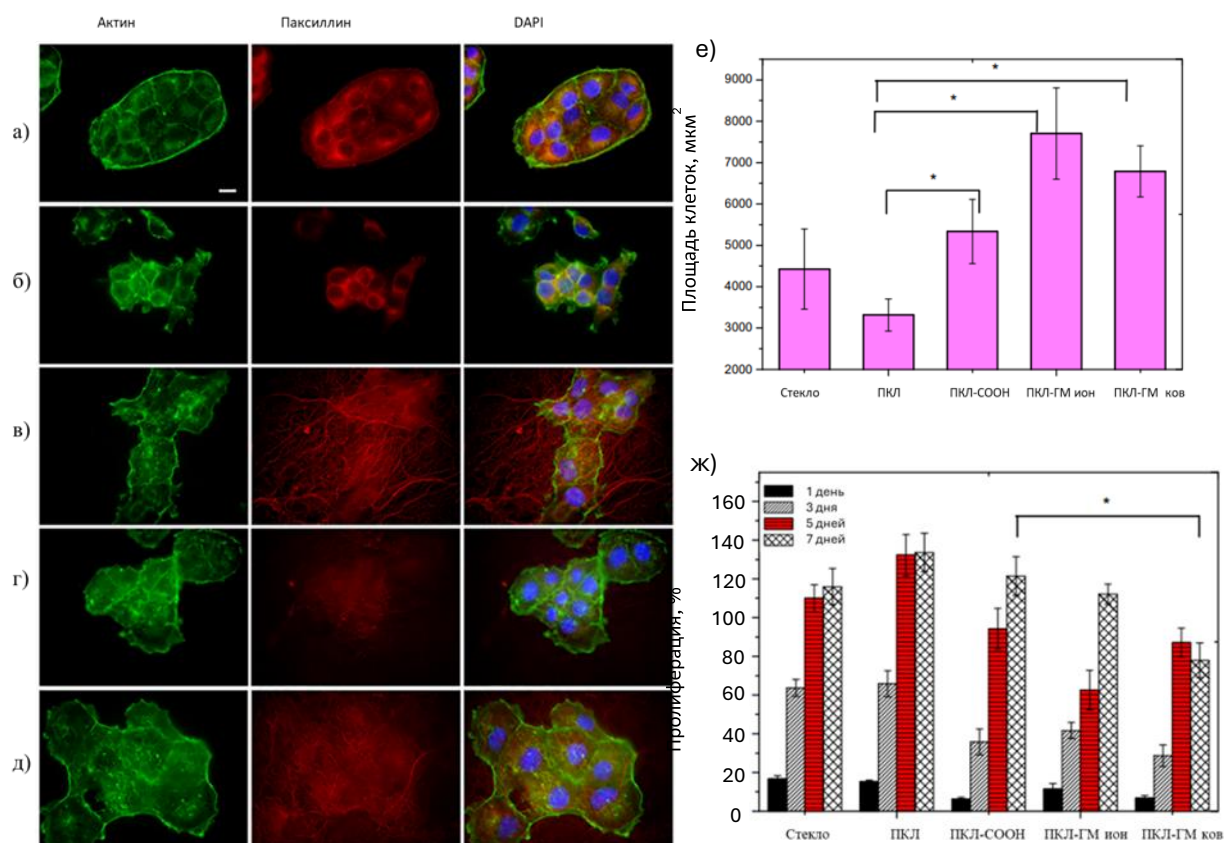


Рисунок 37 – Изображения флуоресцентной микроскопии клеток IAR-2 на поверхности тестируемых образцов (а-д): покровное стекло (а), ПКЛ (б), ПКЛ-СООН (в), ПКЛ-ГМ_{ион} (г) и ПКЛ-ГМ_{ков} (д). Актиновый цитоскелет и клеточные ядра были окрашены Alexa 488 фаллоидин (зеленый) и DAPI (синий), соответственно. Масштаб 10 мкм. Распределение клеток IAR-2(е) на поверхности тестируемых образцов (N = 20). Проплиферация клеток IAR-2(ж) на поверхности разных субстратов. (* $p \leq 0,001$ указывает на статистически значимое различие с контролем ПКЛ (t-тест))

После плазмо-химической обработки нановолокна ПКЛ наблюдалось значительное улучшение распластывания клеток (Рисунок 37е). Иммобилизация гентамицина (образцы ПКЛ-ГМ_{ков} и ПКЛ-ГМ_{ион}) привела также к улучшению адгезивности клеток. Эпителиальные клетки IAR-2 имели гораздо лучше организованную сеть пучков актина и были хорошо распластаны на поверхности образцов. Средняя площадь клеток приведена на Рисунке 37е. Очевидно, плазмо-химическое осаждение слоя карбоксил-содержащего полимера из смеси газов Ar/CO₂/C₂H₄ и иммобилизация гентамицина улучшили прикрепление и распластывание клеток IAR-2. Анализ клеточной пролиферации показал, что IAR-2 эпителиальные клетки были способны эффективно размножаться, как на образцах ПКЛ, так и на образцах ПКЛ-СООН. Различия не были статистически значимыми (критерий Крускала-Уоллиса) (Рисунок 37ж). Было обнаружено, что ковалентная

иммобилизация гентамицина несколько снижает пролиферативный потенциал клеток IAR-2. После инкубации в течение 1, 3 и 5 дней количество клеток на поверхности скаффолдов ПКЛ-ГМ_{ков} было сходным с количеством клеток на поверхности ПКЛ-СООН. При увеличении времени выдержки количество клеток заметно уменьшилось, что указывает на небольшую цитотоксичность, возможно, связанную с адсорбцией ДЦК. Как показал тест Крускала-Уоллиса, разница между нановолокнами ПКЛ-ГМ_{ков} и образцом ПКЛ-СООН была статистически значимой через 7 дней ($p \leq 0,001$). Было отмечено, что нановолокна ПКЛ-ГМ_{ион} с иммобилизованным гентамицином посредством ионной связи, то есть без ДЦК (Рисунок 37ж), демонстрирует более высокую биосовместимость по сравнению с образцом ПКЛ-ГМ_{ков}, т.к. результаты теста на пролиферацию клеток для этих образцов были выше примерно на 30%.

4.2 Получение нанокомпозитных материалов на основе ПКЛ волокон

Наночастицы представляют собой перспективную альтернативу антибиотикам благодаря их широкому спектру действия, многофункциональности, устойчивости к развитию резистентности и универсальности применения. Нанокомпозитные субмикронные волокна с наночастицами представляют собой перспективный класс материалов, который сочетает в себе высокую эффективность против бактерий и уникальные физико-химические свойства. Их применение продолжает расширяться благодаря развитию технологий нанотехнологий и материаловедения, но в данной работе основной акцент сделан на применении в тканевой инженерии и разработке высокоэффективных самоочищающихся фильтров для защиты органов дыхания.

4.2.1 Ионная имплантация серебра в состав волокон ПКЛ-TiCaPCON

Целью данного раздела была имплантация ионов серебра в ПКЛ-TiCaPCON волокна с целью придания материалу антибактериальных свойств. Было выбрано 3 режима ионной имплантации, с целью изучения влияния режимов на содержание серебра. Технологические режимы обработки представлены в Таблице 18.

Таблица 18 – Технологические режимы нанесения покрытия TiCaPCON-Ag на ПКЛ скаффолды

Режим	Условия распыления	Время работы магнетрона, мин	Условия имплантации	Время работы имплантора, мин
1	Расстояние 200 мм Давление 0.1 Па, ток 0.5 А	2	Расстояние 350 мм 15 кВ, 5 мА	4
2		3		10
3		5		15

СЭМ анализ нановолокон показал, что ионная имплантация не влияет на их структуру (Рисунок 38). По данным ЭДС-анализа, содержание Ag во всех образцах ПКЛ-TiCaPCON-Ag было достаточно низким (<0.2 ат.%). Принимая во внимание, что глубина анализируемого слоя в методе ЭДС составляет 1-2 мкм, для более точного определения содержания Ag был проведен РФЭС-анализ для образцов, полученных по режимам 1 и 3, предположительно с наименьшей и наибольшей концентрацией Ag, соответственно.

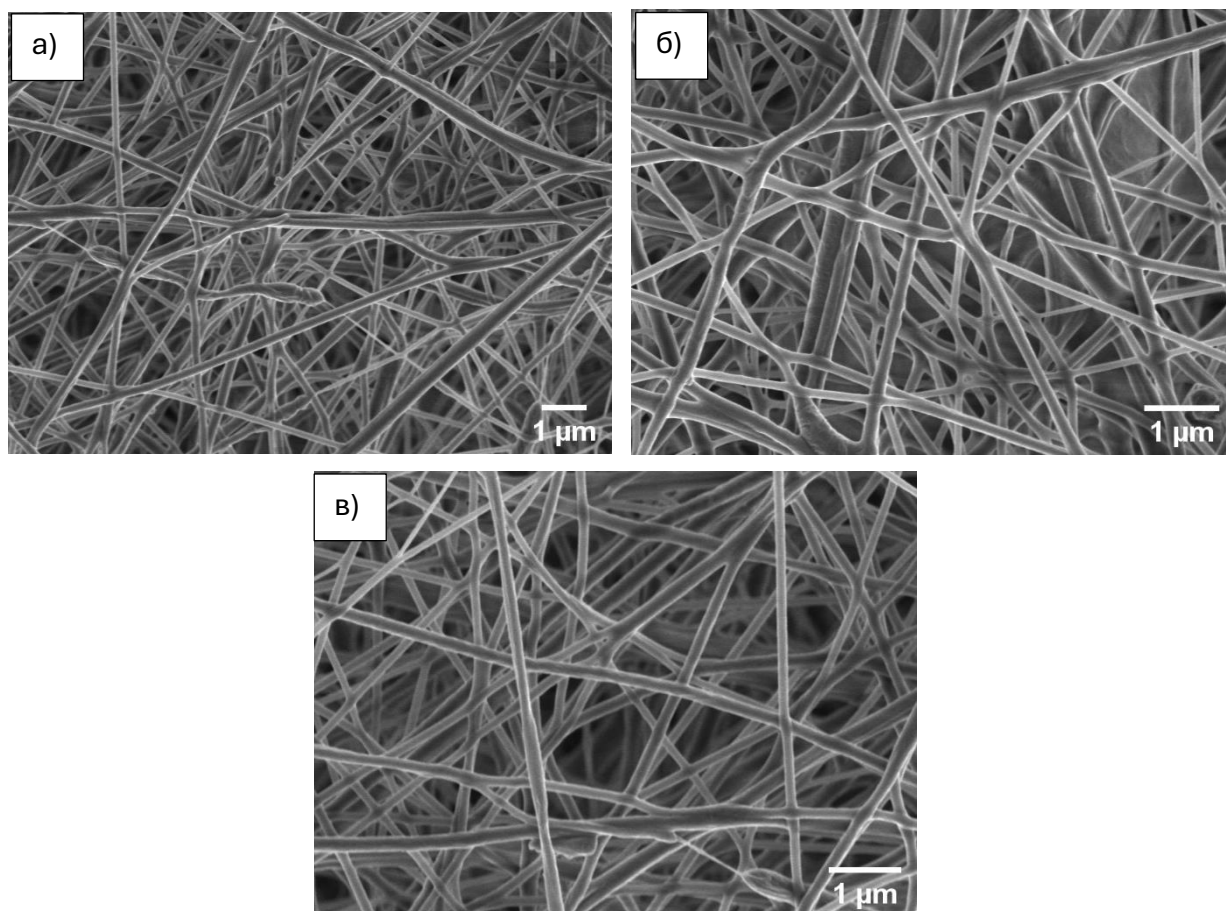


Рисунок 38 – Микрофотографии СЭМ образцов ПКЛ-TiCaPCON-Ag: режим 1 (а), режим 2 (б), режим 3 (в). Масштаб соответствует 1 мкм

Результаты элементного анализа образцов представлены в Таблице 19. РФЭС-анализ ПКЛ волокон с покрытием TiCaPCON-Ag (время обработки 4 и 15 мин) показал, что произошли существенные изменения в химическом составе их поверхности по сравнению с немодифицированными волокнами. При напылении покрытия TiCaPCON в течение 2 мин, на поверхности нановолокон ПКЛ было обнаружено только 3.3 ат.% Ti и 0.2 ат.% Ca. После последующей ионной имплантации серебра в течение 2 мин, его содержание составляло 0.6 ат.%. Напыление покрытия TiCaPCON в течение 5 мин ожидаемо привело к увеличению концентрации Ti до 16.2% и Ca до 0.4 ат.%. Интересно отметить, что более длительная имплантация ионов серебра (15 мин) не только не увеличила его концентрацию на поверхности образца, но, наоборот, привела к следовым количествам серебра (0.1%).

Таблица 19 – Элементный анализ образцов ПКЛ-TiCaPCON-Ag-1,3, полученный методом РФЭС

Образец	Время имплантации Ag, мин	[O], ат.%	[Ti], ат.%	[N], ат.%	[Ag], ат.%	[Ca], ат.%	[C], ат.%	[P], ат.%
ПКЛ-TiCaPCON-Ag-1	4	23.5	3.3	1.8	0.6	0.2	69.7	0.9
ПКЛ-TiCaPCON-Ag-3	15	30.8	16.2	0.8	0.1	0.4	47.7	4.0

Для объяснения полученного результата процесс ионной имплантации был смоделирован с использованием программного обеспечения SRIM-2013 (The Stopping and Range of Ions in Matter). ПКЛ скаффолды являются материалом с низкой плотностью вследствие высокой пористости. Плотность слоя была рассчитана по формуле 5:

$$\rho(\text{ПКЛ}) = \rho(\text{ПКЛ}) * \delta \quad (5)$$

где $\rho(\text{ПКЛ})$ плотность полимера поликапролактона (1.145 г/см^3); δ - пористость ПКЛ скаффолда, определенная с использованием плагина DiameterJ пакета программного обеспечения ImageJ v.052, которая составляла 71%.

Было показано, что при увеличении количества имплантируемых ионов (времени обработки) происходит перераспределение ионов серебра с перемещением их в более глубокие слои (Рисунок 39). Полученные результаты свидетельствуют о том, что большая часть атомов серебра находится в глубине образца и, следовательно, не может быть детектирована методом РФЭС. В то же время, такое распределение серебра в нановолокнах может привести к продолжительному антибактериальному эффекту за счет постепенного выхода ионов серебра.

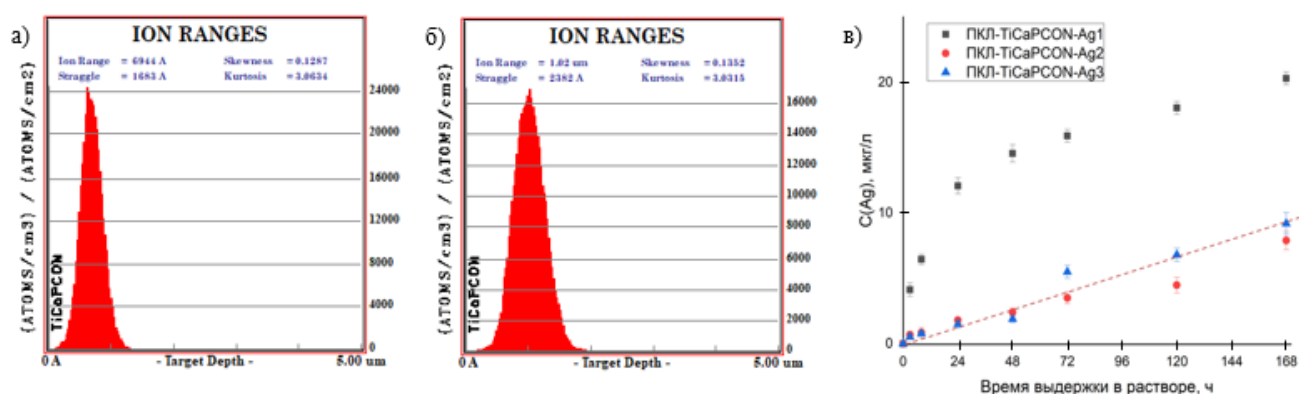


Рисунок 39 – Моделирование распределения ионов Ag в скаффолдах ПКЛ-TiCaPCON-Ag. а- 8000 атомов, б – 24000 атомов; в - кинетика выхода серебра в ФСБ (pH=7.4)

Кинетика выхода ионов серебра в ФСБ у исследованных образцов существенно отличалась (Рисунок 39в). В образце ПКЛ-TiCaPCON-Ag1 наблюдался быстрый выход серебра в течение первых 24 часов (12 мкг/л), после чего скорость выхода серебра снижалась и составляла 1-2 мкг/л/день. В образцах ПКЛ-TiCaPCON-Ag2 и ПКЛ-TiCaPCON-Ag3 зависимость концентрации серебра в растворе от времени имела примерно линейный характер, что связано с постепенным выходом серебра из глубины образца.

Оценка антибактериальной активности полученных материалов проводилась с использованием агар-диффузионного теста: немодифицированные ПКЛ волокна (обозначены на Рисунке 40 символом «к»), ПКЛ-TiCaPCON-Ag1 (обозначены как 21), ПКЛ-TiCaPCON-Ag2 (обозначены как 33), ПКЛ-TiCaPCON-Ag3 (обозначены как 34) была. Поскольку результаты масс-спектрометрического анализа показали низкие концентрации выхода серебра в раствор, а РФЭС анализ подтвердил наличие серебра на поверхности образцов, противомикробное действие оценивали не по наличию зоны ингибирования вокруг образца, а по анализу зоны ингибирования под образцом. Известно, что ионы тяжелых металлов быстро не выводятся из организма, накапливаясь в органах и тканях. Таким образом, локальное бактерицидное воздействие является предпочтительным для таких терапевтических агентов как серебро. Полученные результаты представлены на Рисунке 40 и обобщены в Таблице 20.

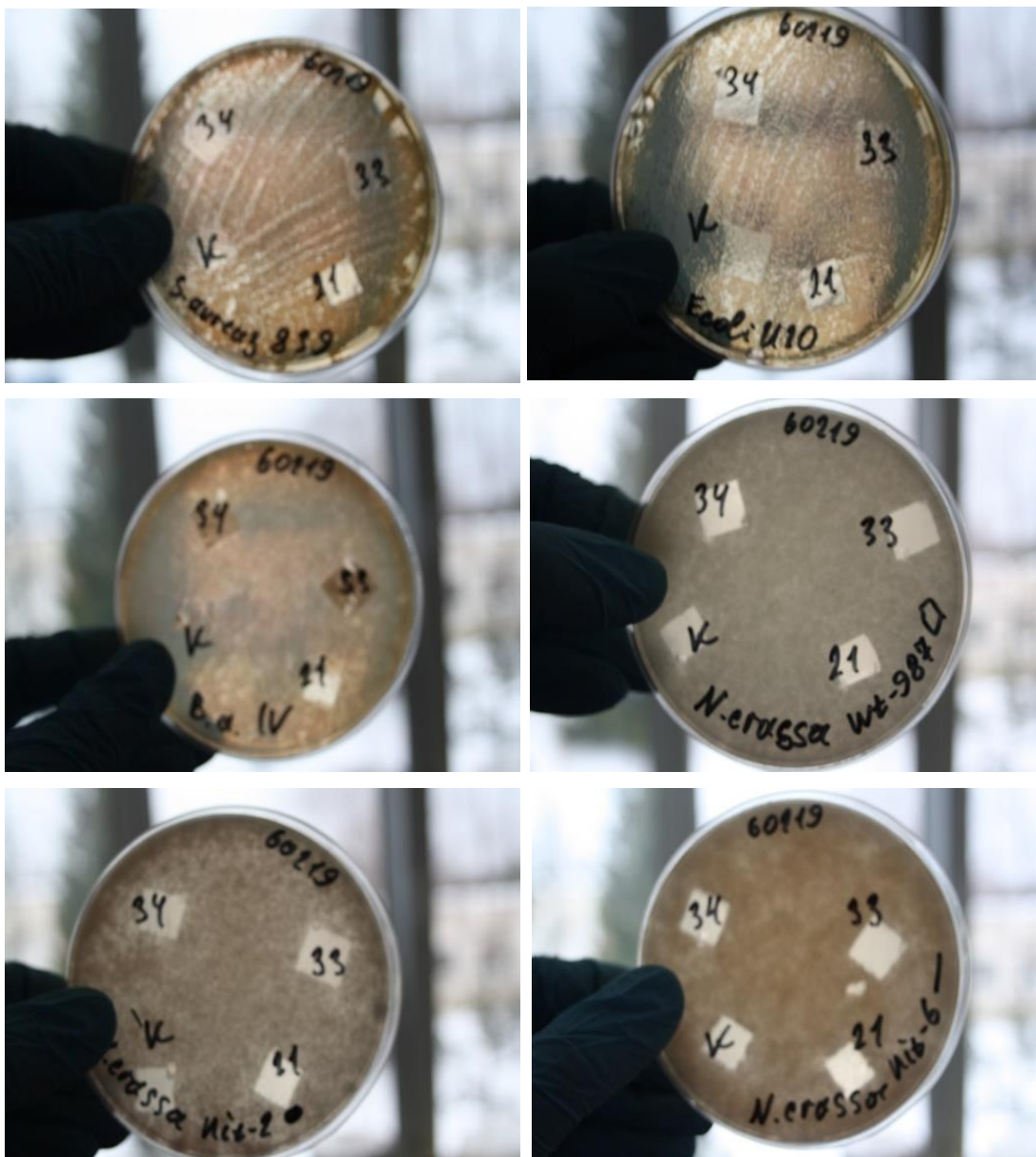


Рисунок 40 – Зоны ингибирования (под образцом) бактерий *S. aureus* 839 (а), *E. coli* U20 (б), *B. anthracis* IV (в), *N. crassa* wt-987 (г), *N. crassa* nit-20 (д), *N. crassa* nit 6 (е) в течение 24 часов для образцов ПКЛ (обозначены символом «к»), ПКЛ-TiCaPCON-Ag1 (обозначены номером 21), ПКЛ-TiCaPCON-Ag2 (обозначены номером 33), ПКЛ-TiCaPCON-Ag3 (обозначены номером 34)

Таблица 20 – Антибактериальный эффект после инкубации с тестируемыми образцами

Тип штамма	Антибактериальный эффект			
	ПКЛ	ПКЛ-TiCaPCON-Ag1	ПКЛ-TiCaPCON-Ag2	ПКЛ-TiCaPCON-Ag3
<i>N. crassa</i> wt987	-	+	-	-
<i>N. crassa</i> nit 6	-	+	-	-
<i>N. crassa</i> nit 2	-	+	-	-
<i>E. coli</i> U20	-	+	-	-

Тип штамма	ПКЛ	ПКЛ-TiCaPCON-Ag1	ПКЛ-TiCaPCON-Ag2	ПКЛ-TiCaPCON-Ag3
<i>S. aureus</i> 839	-	+	-	-
<i>B. anthracis</i> IV	-	+	-	-

Образец ПКЛ-TiCaPCON-Ag1, полученный после 4 мин ионной имплантации Ag^+ с детектируемым количеством Ag на поверхности около 0.5 ат.%, проявляет антибактериальный эффект против всех исследуемых микроорганизмов. Образцы ПКЛ-TiCaPCON-Ag2 и ПКЛ-TiCaPCON-Ag3 не оказали видимого эффекта ни для одного из тестируемых штаммов, что обуславливается перемещением серебра в более глубокие слои материала и низкой скоростью высвобождения.

4.1.2 Формирование наночастиц Ag_2O на поверхности ПКЛ-СООН

Целью данного раздела являлась оценка способности полимерного слоя, полученного методом плазмохимического осаждения из смеси газов $\text{Ar}/\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_4$, связывать и удерживать на своей поверхности ионы серебра, а затем восстанавливать их до наночастиц. Для формирования наночастиц Ag_2O на поверхности волокон ПКЛ использовали карбоксил-модифицированные волокна, которые погружали в раствор нитрата серебра. После этого захваченные ионы Ag^+ , связанные с карбоксильными группами, восстанавливались до наночастиц Ag_2O под действием УФ-облучения. На Рисунке 41 представлены СЭМ-изображения исходных нановолокон ПКЛ и модифицированных ПКЛ-Ag. Средний диаметр нановолокон составил 270 ± 50 нм, что было определено путем анализа изображений 100 случайно выбранных волокон из каждого образца с помощью программы ImageJ. После модификации структура нановолокон не была нарушена, однако поверхность образца ПКЛ-Ag стала более шероховатой по сравнению с исходной. Данные энергодисперсионного рентгеновского микроанализа (ЭДС) подтвердили равномерное распределение серебра по поверхности волокон ПКЛ-Ag, хотя также были выявлены отдельные крупные агломераты наночастиц Ag. В Таблице 21 приведены результаты элементного анализа образцов до и после испытания на стабильность. Как видно из таблицы, выдерживание в воде в течение 24 часов привело к снижению содержания наночастиц Ag в композите на 0.7 ат.%.

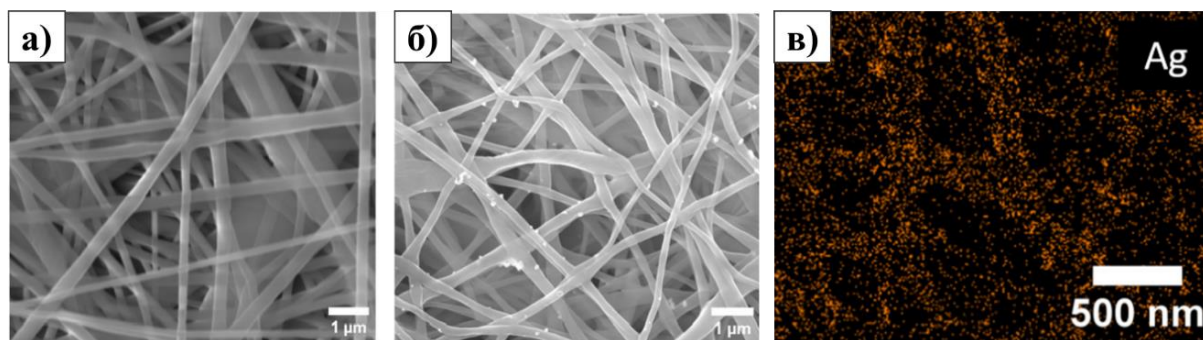


Рисунок 41 – СЭМ-изображения образцов ПКЛ (а), ПКЛ-Ag (б) и карта распределения Ag по поверхности ПКЛ-Ag (в)

Таблица 21 – Атомный состав образцов ПКЛ-Ag и ПКЛ-Ag-24ч, определенный методом ЭДС

Образец	[C], ат. %	[O], ат. %	[Ag], ат. %	[Pt], ат. %
ПКЛ	73.9	26.0	-	0.1
ПКЛ-Ag	89.9	9.9	1.1	0.1
ПКЛ-Ag-24ч	91.1	8.4	0.4	0.1

Для исследования химического состава поверхности образцов был применён РФЭС анализ. Атомные концентрации элементов для всех исследуемых образцов представлены в Таблице 22. Высокая степень функционализации поверхности наночастицами серебра подтверждена значительной атомной долей Ag, составляющей 5 ат.%. После выдерживания образцов в деионизированной воде в течение 24 часов наблюдалось изменение количественного содержания серебра на поверхности; тем не менее, значительная часть наночастиц Ag оставалась на поверхности, что свидетельствует о наличии прочных связей между наночастицами и нановолокнистой матрицей.

Отмечено расхождение между результатами РФЭС- и ЭДС-анализов (Таблицы 21, 22), вероятно обусловленное различиями в глубине зондирования методов: ~10 нм для РФЭС и ~1000 нм для ЭДС. Существенные отличия в концентрации Ag указывают на то, что наночастицы серебра преимущественно локализованы в тонких поверхностных слоях материала. Кроме того, предполагается, что часть наночастиц Ag не взаимодействует с карбоксильными группами матрикса, а механически удерживается в трёхмерной структуре волокон. Это позволяет предположить их частичную десорбцию при контакте с водной средой.

Данный вывод согласуется с результатами индуктивно-связанной плазмы с атомно-эмиссионным спектрометром (ИСП АЭС), показавшими быстрое высвобождение ионов Ag в первые 3 часа экспозиции, после чего процесс переходит в фазу медленного кинетического высвобождения (Рисунок 42).

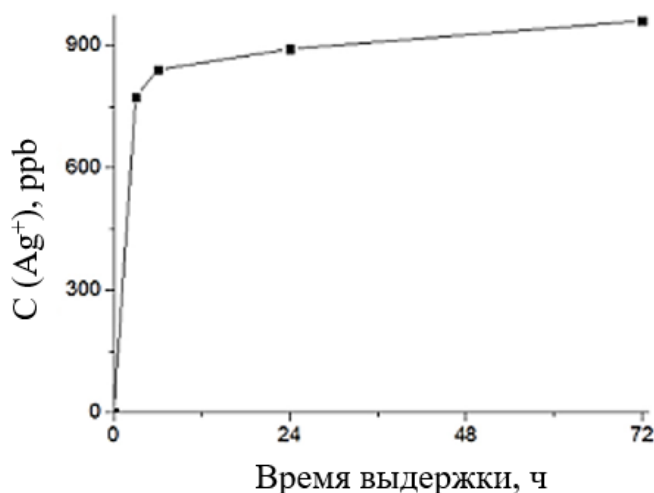


Рисунок 42 – скорость высвобождения Ag^+ из состава ПКЛ-Ag при выдержке в воде в течение 72 ч

Таблица 22 – атомный состав образцов ПКЛ-Ag и ПКЛ-Ag-24ч, определенный методом РФЭС

Образец	[C], ат. %	[O], ат. %	[Ag], ат. %	[N], ат. %
ПКЛ	74.0	26.0	0.0	0.0
ПКЛ-СООН	72.5	27.5	0.0	0.0
ПКЛ-Ag	67.7	26.7	3.5	2.1
ПКЛ-Ag-24ч	71.9	23.9	2.3	1.9

РФЭС анализ показал значительные различия в элементном составе образцов, что связано с различной глубиной зондирования данного метода. Как видно из данных Таблицы 24, концентрация серебра была наибольшей, тогда как содержание углерода оказалось минимальным. Также в составе были обнаружены незначительные, следовые, количества азота.

Для более точного определения химического состояния и окружения всех выявленных элементов были исследованы высокоразрешающие спектры соответствующих фотоэлектронных линий. С этой целью проводился детальный анализ спектров $\text{C}1s$, $\text{O}1s$, $\text{N}1s$ и $\text{Ag}3d$ с целью уточнения характера химических связей на поверхности нановолокон ПКЛ, включая модифицирующие наночастицы серебра. Спектр $\text{C}1s$ для ПКЛ (Рисунок 43а) был аппроксимирован суммой трёх компонент, соответствующих следующим химическим состояниям: углеводородные группы CH_x (285.0 эВ), эфирные группы C-O (286.4 эВ) и сложноэфирные группы C(O)-O (289.0 эВ). Эти значения согласуются с литературными данными и указывают на наличие функциональных групп, характерных для полимерной матрицы. Спектр РФЭС $\text{C}1s$ ПКЛ-Ag (Рисунок 43б) был составлен с использованием четырех компонентов, CH_x , C-O , C=O и C(O)O , и CH_x был доминирующим окружением.

Более интересные результаты были получены из спектров O1s, представленных на Рисунке 43д-е. Спектр O1s ПКЛ-Ag состоял в основном из углеродно-кислородных связей (C-O и C=O, с пиком при 532.1 эВ и 533.3 эВ, соответственно, FWHM = 1.7 эВ), но также была обнаружена связь Ag₂O(530.8 эВ, FWHM = 1.7 эВ), что является типичным положением для кислорода в оксидах металлов. Наночастицы серебра покрывали поверхности волокон, и 3.5% Ag было обнаружено с помощью РФЭС (Таблица 22). РФЭС спектр Ag3d5/2 был обусловлен одним компонентом: либо металлическим серебром, либо оксидом серебра (I) Ag⁰/Ag⁺ (ЭС = 368.0 ± 0.1 эВ, FWHM = 1.2 эВ). После вымачивания в воде концентрация серебра немного снизилась, тем не менее 2.4 ат. % серебра можно считать очень высокой концентрацией.

Спектры N1s до и после погружения в воду показаны на Рисунке 43и-к. Спектр до погружения в воду состоял из трех компонентов: амидов N-C=O (ЭС = 399.8 эВ), протонированных аминов NH₃⁺ (ЭС = 401.6 эВ) и нитратов NO₃⁻ (ЭС = 406.4 эВ). После вымачивания в воде в течение 24 ч были видны практически только N-C=O, с незначительной концентрацией протонированных аминов; нитраты не были обнаружены. Присутствие нитрата NO₃⁻ с концентрацией 0.6 ат.% указывает на то, что на поверхности присутствовало некоторое количество непрореагировавшего нитрата серебра. Его высвобождение во время промывки может объяснить снижение концентрации серебра после погружения в воду. Это также повлияло на количество ионов серебра, высвободившихся в первые часы.

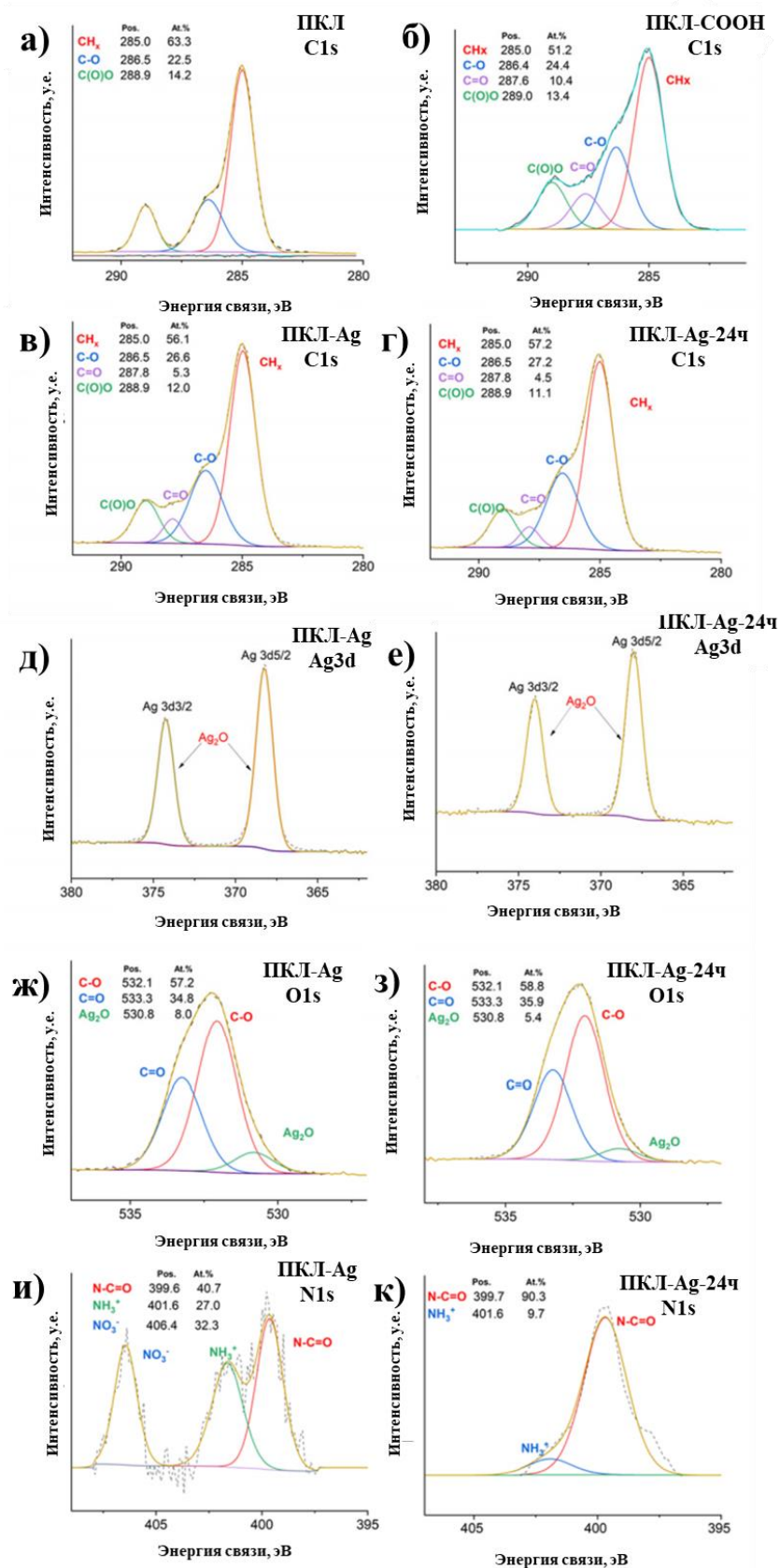


Рисунок 43 – РФЭС спектры C1s для ПКЛ (а), ПКЛ-СООН (б), ПКЛ-Ag (в) и ПКЛ-Ag-24 ч (г). РФЭС спектры Ag3d (д, е), O1s (ж, з) и N1s (и, к) для ПКЛ-Ag и ПКЛ-Ag-24 ч после обработки водой

Оценка антимикробной активности свидетельствует о том, что образцы ПКЛ-Ag проявили мощный антибактериальный эффект против всех протестированных штаммов, как показано на Рисунке 44. После 6 ч инкубации мы наблюдали 100% антибактериальную активность; не было выявлено ни одного значения бактерий *E. coli* U20 (как показано на Рисунке 44а) или *Candida auris* CBS10913 (как показано на Рисунке 44г). Другие штаммы, включая *S. aureus* MW2, *Candida parapsilosis* ATCC90018 и *Candida albicans* ATCC90028, показали снижение количества колониеобразующих единиц от 2 до 4 порядков (как показано на Рисунке 44б, в, д, соответственно). Было показано, что образцы ПКЛ-Ag полностью ингибируют формирование биопленок грибковыми штаммами.

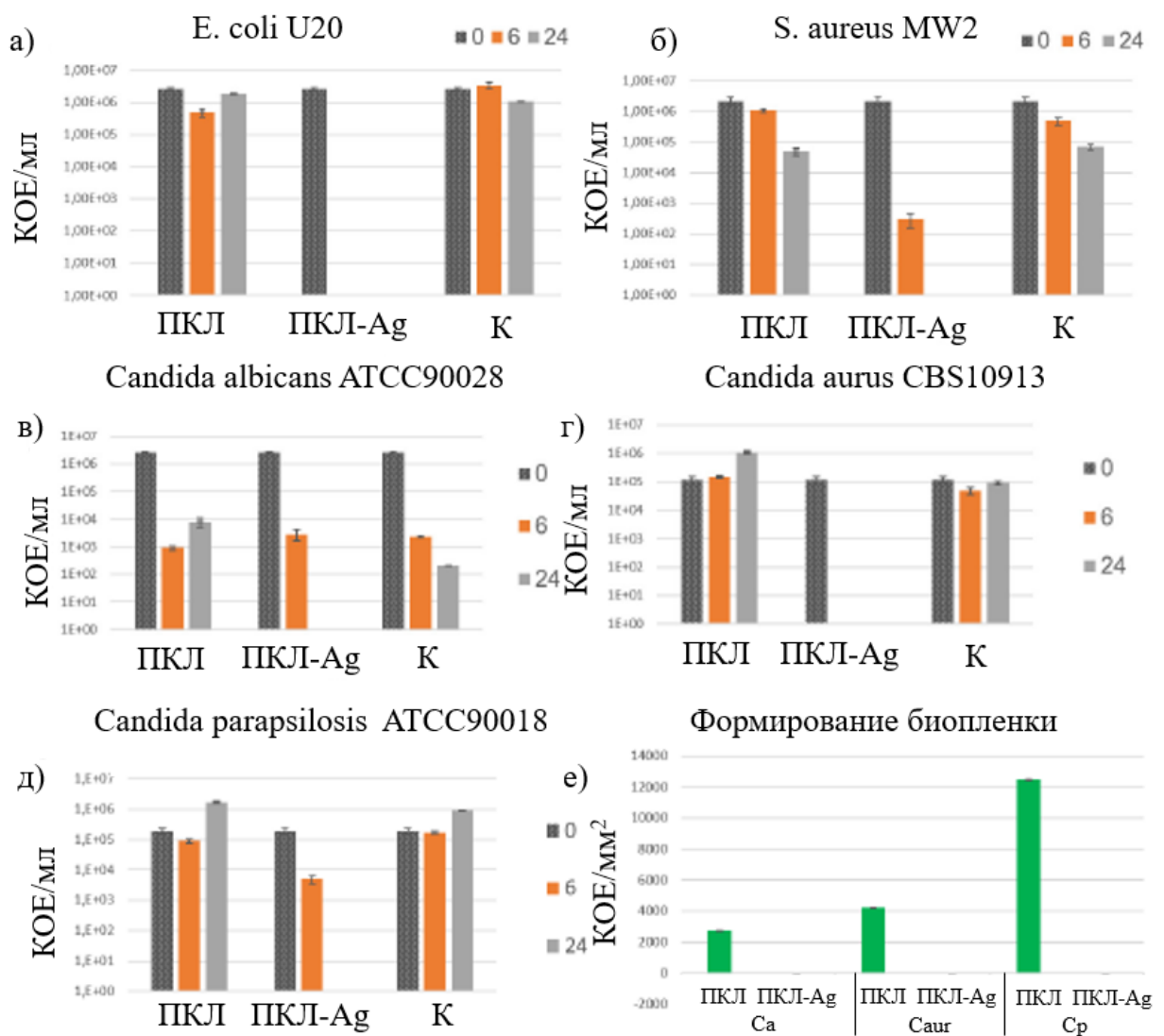


Рисунок 44 – Концентрация патогенных штаммов в КОЕ/мл после инкубации с тестируемыми образцами для *E.coli* U20 (а), *S.aureus* MW2 (б), *Candida albicans* ATCC90028 (в), *Candida auris* CBS10913 (г), *Candida parapsilosis* ATCC90018 (д). Формирование биопленок на образцах ПКЛ и ПКЛ-Ag грибковыми штаммами (е)

Напротив, все немодифицированные образцы демонстрировали различную плотность биопленки. Однако ни один из образцов волокон ПКЛ, модифицированных Ag, не показал образования биопленки, как показано на Рисунке 44е. Полученные результаты свидетельствуют о том, что нановолокна ПКЛ-Ag эффективно предотвращают образование биопленки, что очень важно для предотвращения инфекций в медицинских целях. Таким образом, наши результаты демонстрируют значительную антимикробную активность ПКЛ-Ag нановолокон против широкого спектра микроорганизмов.

4.1.3 Иммобилизация наночастиц оксида цинка на поверхности ПКЛ-COОН

Целью данного раздела была оценка способности плазменно-осажденного полимерного слоя, содержащего карбоксильные группы захватывать и удерживать наночастицы ZnO на поверхности ПКЛ волокон, а также оценка антибактериальной активности полученных материалов. Морфология синтезированных наночастиц ZnO была изучена методами СЭМ (Рисунок 45 а) и ПЭМ (Рисунок 45 б-г) при различных увеличениях[207]. Большинство НЧ ZnO сферические, хотя некоторые имеют огранку. На ПЭМ-изображении высокого разрешения видно, что межплоскостное расстояние составляет 0.249 нм, что соответствует (101) плоскостям гексагонального ZnO ($d = 0.247$ нм, mp-2133). Очевидных дефектов в НЧ не наблюдается. Изображение HAADF-STEM и соответствующие карты ЭДС представлены на Рисунке 45 д-ж. Наличие цинка и кислорода, которые равномерно распределены внутри НЧ, указывает на образование ZnO. На основании 100 измерений с использованием программы ImageJ средний размер НЧ ZnO был определен как 10.5 ± 1.6 нм, что хорошо согласуется с распределением размеров, определенным методом ДРС (Рисунок 45 з). Дзета-потенциал НЧ ZnO составил +54 мВ, что обеспечивает образование стабильной суспензии[207].

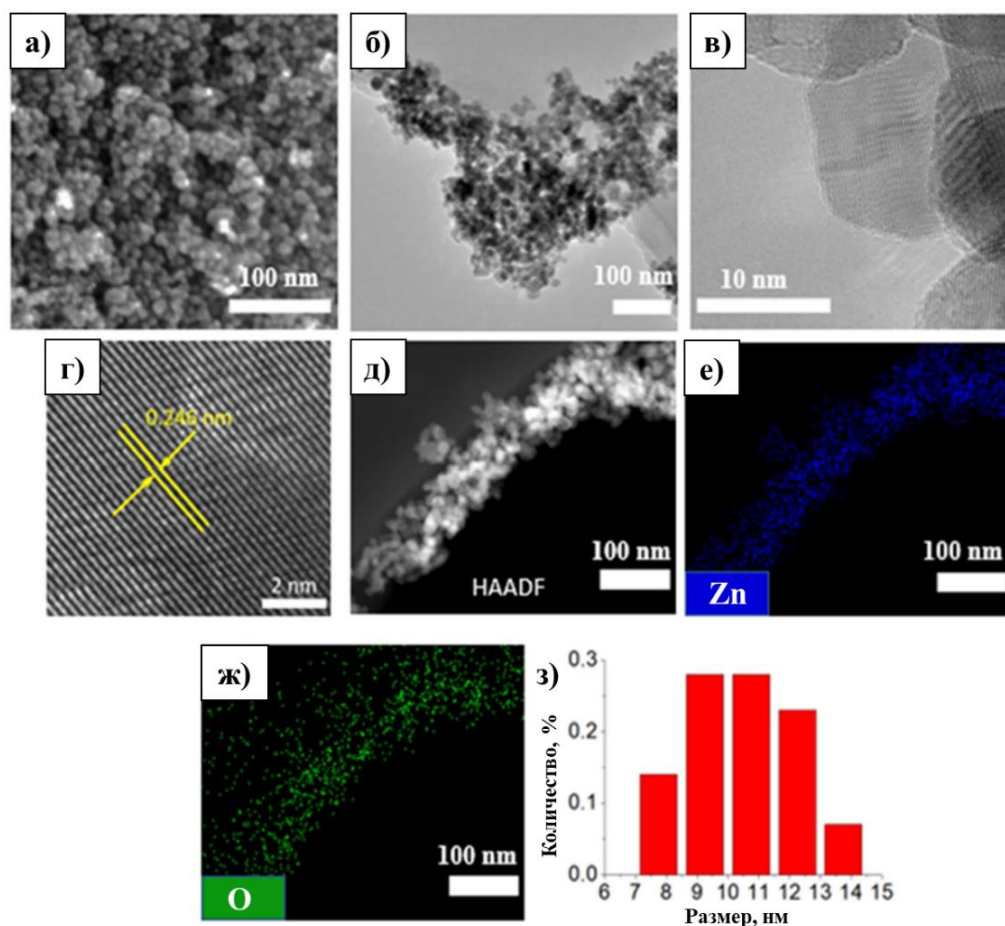


Рисунок 45 – СЭМ (а), ПЭМ (б) и ПЭМ высокого разрешения (в, г) изображения НЧ ZnO.

HAADF-STEM изображение (д) с соответствующими картами элементов ЭДС (е, ж).

Распределение НЧ ZnO по размерам, оцененное методом ДРС (з)[207]

Для получения композитных волокон ПКЛ-ZnO, карбокси-модифицированные образцы (ПКЛ-COOH) выдерживали в суспензии синтезированных наночастиц ZnO ($C = 2$ мг/мл) в течение 1 ч. Для оценки стабильности полученных композитных волокон, их погружали в дистиллированную воду на 24 ч. СЭМ-изображения и соответствующие карты распределения элементов, полученные методом ЭДС в образцах ПКЛ-ZnO и ПКЛ-ZnO-24ч до и после погружения в воду показаны на Рисунке 46. Видно, что Zn и O равномерно распределены по поверхности волокон ПКЛ-ZnO и ПКЛ-ZnO-24ч. Химический состав образцов, определенный методом ЭДС, до и после испытания на стабильность приведен в Таблице 23. Замачивание в воде в течение 24 ч снижает атомную концентрацию Zn в композиционных волокнах на 0.7 ат. %.

Таблица 23 – Атомный состав образцов ПКЛ-ZnO и ПКЛ-ZnO-24ч, определенный методом ЭДС

Образец	[C], ат. %	[O], ат. %	[Zn], ат. %	[Pt], ат. %
ПКЛ-ZnO	86.9	6.0	5.7	1.4
ПКЛ-ZnO-24ч	88.4	5.3	5.0	1.3

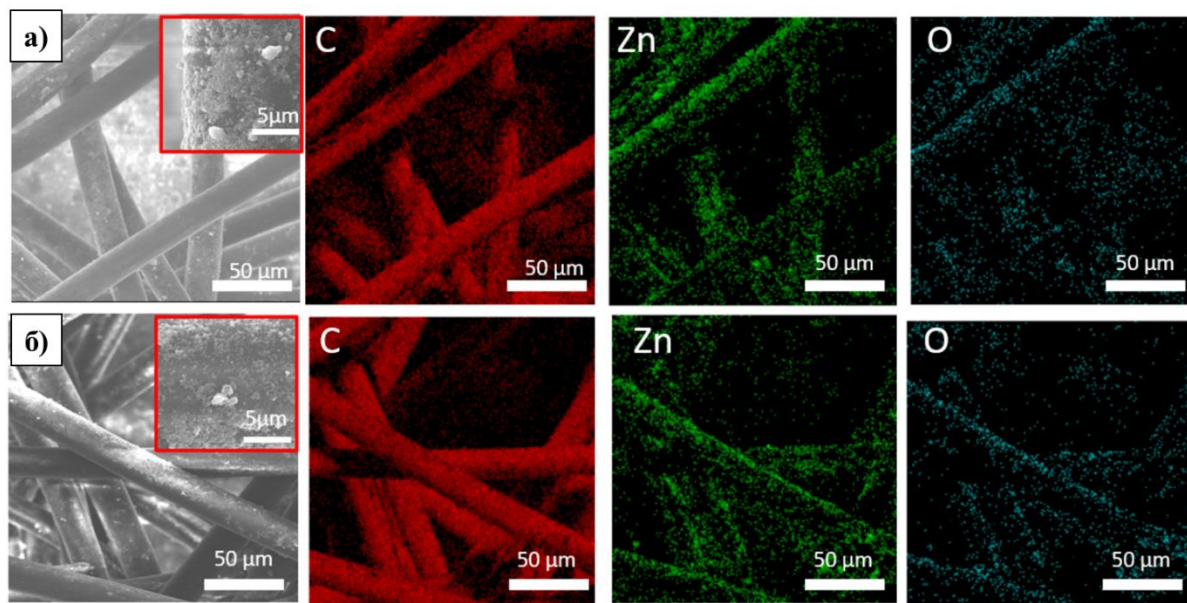


Рисунок 46– СЭМ-изображения и соответствующие элементные карты ЭДС образцов ПКЛ-ZnO и ПКЛ-ZnO-24[207]

Для определения состава поверхности образцов использовался РФЭС-анализ. Атомные составы всех образцов приведены в Таблице 24. Высокая концентрация Zn (5 ат.%) подтверждает высокую дозу загрузки НЧ ZnO на поверхность волокна. Количество Zn на поверхности не уменьшилось после замачивания в деионизированной воде в течение 24 ч, что подтверждает сильную адгезию НЧ ZnO к карбоксимодифицированным волокнам. Химический состав материалов несколько отличаются от результатов ЭДС (Таблица 23), что, скорее всего, связано с разной глубиной анализа: ~10 нм (РФЭС) и ~1000 нм (ЭДС)[207]. Можно также предположить, что не все НЧ ZnO были прочно связаны с карбоксильными (COOH) группами, а некоторые из них просто механически застряли в трехмерной волокнистой структуре и, следовательно, были вымыты.

Таблица 24 – Атомный состав образцов ПКЛ-ZnO и ПКЛ-ZnO-24ч, определенный методом РФЭС

Образец	[C], ат. %	[O], ат. %	[Zn], ат. %
ПКЛ	73.9	26.1	0.0
НЧ ZnO	17.4	42.3	40.3
ПКЛ-ZnO	69.0	25.9	5.0
ПКЛ-ZnO-24ч	70.8	24.1	5.1

Для дальнейшего изучения состава поверхности нановолокон ПКЛ с осажденными НЧ ZnO были проанализированы РФЭС спектры высокого разрешения C1s, O1s и Zn2p. РФЭС-спектр C1s для ПКЛ (не показан) определялся суммой трех компонентов, а именно углеводородов CH_x (ЭС = 285 эВ), эфирной группы C-O (ЭС = 286.4 эВ) и сложноэфирной группы C(O)O (ЭС = 289.0 эВ), что согласуется с предыдущими результатами. Спектр C1s НЧ ZnO представлен на Рисунке 47. Присутствие незначительного количества углерода на поверхности указывает на то, что некоторые загрязняющие вещества были адсорбированы на НЧ. Спектры C1s для ПКЛ-ZnO и ПКЛ-ZnO-24ч были разложены по сумме четырех компонентов: CH_x (ЭС = 285 эВ), эфирная группа C-O (ЭС = 286.4 эВ), карбонильная группа C=O (ЭС = 287.7 эВ) и сложноэфирная группа C(O)O (ЭС = 289.0 эВ). Ширина всех пиков (FWHM) была установлена на 1.4 эВ.

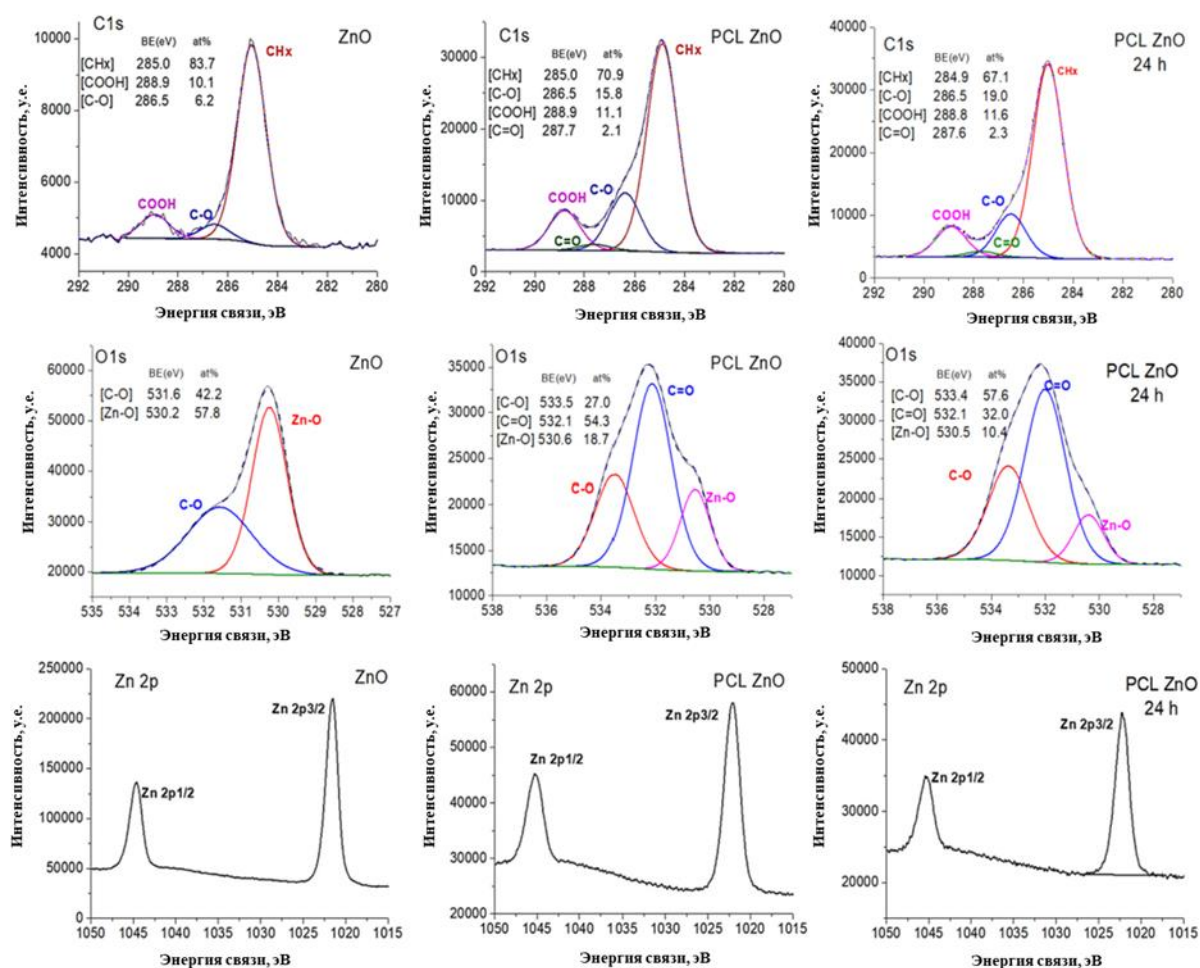


Рисунок 47 – РФЭС-спектры C1s, O1s и Zn2p образцов ZnO, ПКЛ-ZnO и ПКЛ-ZnO-24ч

Наиболее важные результаты были получены при анализе спектров O1s (Рисунок 47). РФЭС-спектр НЧ ZnO соответствовал в основном связям Zn-O с центром при 530,2 эВ (FWHM = 1,1 эВ), что является типичным положением для кислорода в оксидах металлов. Второй компонент при 531,6 эВ может быть связан с присоединением кислорода к углероду, который находится на поверхности из-за загрязнения. Пик Zn-O также наблюдается в РФЭС-спектрах образцов ПКЛ-ZnO и ПКЛ-ZnO-24ч. Площадь пика не изменилась после вымачивания в воде в течение 24 ч (ПКЛ-ZnO-24 ч). Спектр Zn2p также не изменился после вымачивания в воде, что указывает на вклад только ZnO[207].

ИК-Фурье спектры исследуемых образцов, измеренные в диапазоне 4000-400 см^{-1} , представлены на Рисунке 48а. Подготовленные НЧ ZnO демонстрируют пики при 489, 883, 1413, 1584 и 3440 см^{-1} . Острый пик, расположенный при 489 см^{-1} , относится к растягивающим колебаниям Zn-O. Многочисленные пики ИК-Фурье спектров в диапазоне 1700-600 см^{-1} могут быть отнесены к колебаниям C=O, C-O, C-C и C-H. Широкий максимум, наблюдаемый при 3440 см^{-1} , приписывается растягивающим колебаниям

гидроксильных соединений (адсорбированная вода). Полосы при 2946 и 2845 см^{-1} , особенно заметные в ИК-Фурье спектрах образцов ПКЛ и ПКЛ-ZnO, относятся к углеводородам (группы CH_3 и CH_2 , соответственно). После модификации волокна ПКЛ-СООН с помощью НЧ ZnO виден пик при 489 см^{-1} (вставка), что можно объяснить вкладом НЧ ZnO[207].

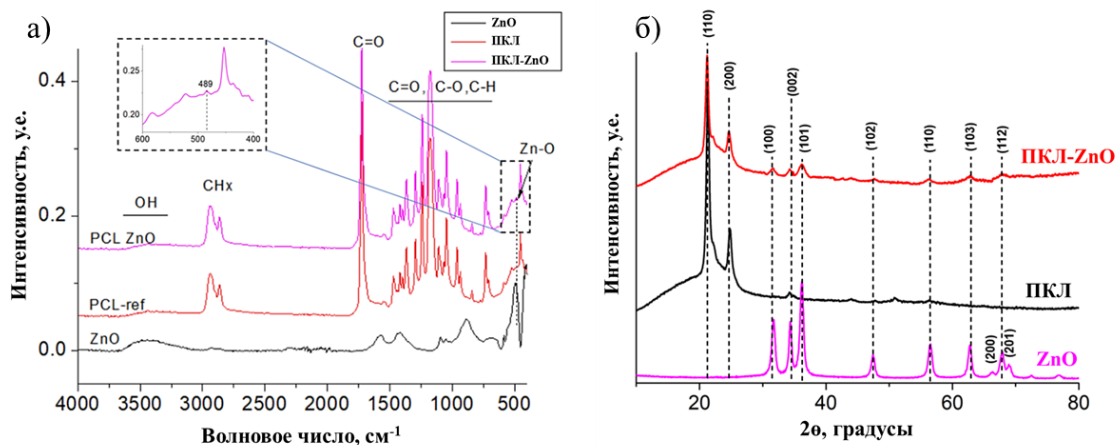


Рисунок 48 – а) ИК-Фурье спектры и б) РФА дифрактограммы НЧ ZnO, ПКЛ и ПКЛ-ZnO

Результаты рентгеноструктурного анализа (РФА) нановолоконной мембраны из ПКЛ представлены на Рисунке 48б, где обнаружен острый кристаллический пик при 21,5° (110) и относительно малоинтенсивный пик при 23,6° (200), что объясняется полукристаллической природой полимера ПКЛ. Дифракционные пики, расположенные при 31,6°, 34,3°, 36,1°, 47,4°, 56,4°, 68,1° и 69,2°, соответствуют плоскостям отражения (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) и (201) гексагональной структуры ZnO (JCPDS: 03-065-3411). В образце ПКЛ-ZnO были обнаружены пики, относящиеся к НЧ ZnO[227].

Скорость высвобождения ионов цинка из состава образцов ПКЛ-ZnO представлена на Рисунке 49. В первые 24 часа наблюдается высокий выход Zn^{+2} на уровне 1200 $\text{мкг/л} \times \text{см}^2$, что может быть обусловлено высвобождением не связавшихся наночастиц из пор материала, в дальнейшем выход замедляется и составляет 100 $\text{мкг/л} \times \text{см}^2$, что может обуславливаться как постепенным растворением наночастиц, так и гидролизом сложноэфирных связей.

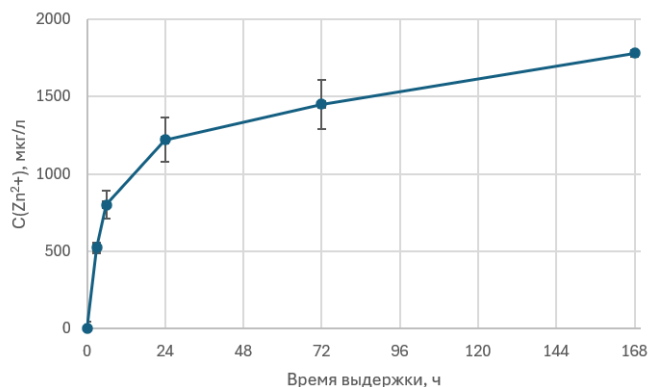


Рисунок 49 – скорость высвобождения Zn^{+2} из ПКЛ-ZnO

Антимикробная активность образцов ПКЛ и ПКЛ-ZnO была исследована в отношении Грамположительных (*Staphylococcus aureus* CSA154) и Грамотрицательных (*Escherichia coli* U20) штаммов бактерий, кроме того, была проведена оценка фунгицидной активности против 2 штаммов грибов (*Candida parapsilosis* ATCC90018, *Neurospora crassa*)[207]. Результаты анализа представлены на Рисунке 50. Было показано, что образцы ПКЛ-ZnO полностью ингибируют штаммы *Neurospora crassa*, *Escherichia coli* U20 и *Staphylococcus aureus* CSA154, и приводит к существенному ингибированию штамма *Candida parapsilosis* ATCC90018 (снижение численности КОЕ на 2 порядка).

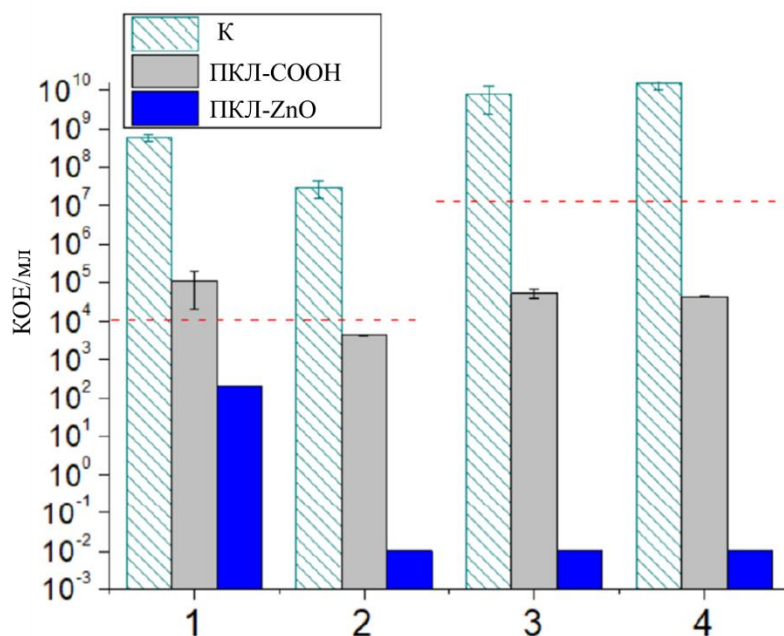


Рисунок 50 – Противогрибковая и антибактериальная активность ПКЛ-COOH и ПКЛ-ZnO в отношении *Candida parapsilosis* ATCC90018 (1), *Neurospora crassa* (2), *Escherichia coli* U20 (3) и *Staphylococcus aureus* CSA154 (4) оценивали по количеству КОЕ через 24 ч. К-контроль без образца[207]. Пунктирные горизонтальные линии показывают начальную концентрацию клеток

4.3 Выводы по главе 4

1. Показано, что аминогруппы гентамицина взаимодействует с карбоксильными группами плазменно-модифицированных ПКЛ волокон за счет электростатических и ковалентных связей. Методом РФЭС показана высокая стабильность поверхностно-иммобилизованного гентамицина, вне зависимости от типа связи, который сохраняется на поверхности образцов после их выдержки в воде при 37 °C в течение 48 ч. Установлено, что количество иммобилизованного гентамицина, определенное по количеству его полного выхода методом спектрофотометрии,

зависит от типа связи и составляет 345 ± 15 (ионная связь) и 195 ± 11 мкг/мл (ковалентная связь). Показано, что в зависимости от типа связи, можно регулировать количество сорбированного гентамицина и скорость его выхода. Ковалентное присоединение антибиотика обеспечивает более равномерный его выход на протяжении 3 дней. Были исследованы антибактериальные свойства полученных материалов в отношении различных штаммов кишечной палочки (*E. coli*), обладающих различной минимальной ингибиторной концентрацией (МИК) к гентамицину. Показано, что размер зоны ингибирования коррелирует с МИК, при этом образцы с ковалентно-связанным гентамицином (ПКЛ-ГМ_{ков}), в отличие от электростатически связанного гентамицина (ПКЛ-ГМ_{ион}) демонстрируют пролонгированный антибактериальный эффект после выдержки в воде в течение 48 ч. Была показана высокая биосовместимость образцов в отношении эпителиальных клеток IAR-2.

2. Показано, что ионы Ag^+ , введенные в состав покрытий TiCaPCON методом ионной имплантации (ИИ), не влияют на структуру нановолокон ПКЛ. С увеличением времени ИИ (4, 10 и 15 мин) концентрация Ag на поверхности, детектируемая методом РФЭС, снижалась. На основе результатов теоретического моделирования это объясняется тем, что большая часть атомов Ag находится в глубине образца. Методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой установлено, что кинетика выхода Ag в физиологический раствор (ФР) зависит от времени ИИ. Линейная скорость выхода Ag в ФР наблюдалась после ИИ в течение 10 и 14 мин, что связано с постепенным диффузионным выходом Ag в течение 7 дней. При краткосрочной обработке (4 мин) наблюдался выход Ag^+ ионов на уровне 12 мкг/л в течение первых 24 часов, после чего скорость выхода ионов Ag^+ постепенно снижалась и соответствовала 1-2 мкг/л/день. Показано локальное антибактериальное действие образцов ПКЛ-TiCaPCON-Ag1 (4 мин) в отношении патогенов *N. crassa* wt987, *N. crassa* nit 6, *N. crassa* nit 2, *E. coli* U20, *S. aureus* 839, *B. anthracis* IV.
3. Показано, что плазменно-осажденный полимерный слой на поверхности волокон ПКЛ способствует формированию наночастиц Ag_2O при выдержке в растворе нитрата серебра с последующим восстановлением под действием УФ-излучения. Показано, что полученные композитные волокна достаточно стабильны в воде в течение 24 часов и проявляют высокую антипатогенную активность в отношении широкого спектра патогенных штаммов грибов и бактерий.

4. Показано, что карбоксил-содержащий полимер на поверхности волокон ПКЛ эффективно взаимодействует с наночастицами ZnO, формируя нанокомпозитный материал с высокой стабильностью и равномерным распределением наночастиц ZnO. Установлена высокая антипатогенная активность материала ПКЛ-ZnO в отношении *C. parapsilosis* ATCC90018, *N. crassa*, *E. coli* U20 и *S. aureus* CSA154.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ ПО РАБОТЕ

1. Установлены технологические режимы получения электроформованных волокон ПКЛ с диаметром распределения волокон 50-500 нм; микроструктура полученных нетканых материалов имитирует структуру внеклеточного матрикса. Оптимальные режимы электроформования: концентрация ПКЛ в формообразующем растворе из смеси муравьиной и ледяной уксусной кислот составляет 25 вес.%, прилагаемое напряжение 50 кВ, скорость подачи полимерного раствора 0.13 мкл/сек.
2. Разработаны технологические режимы осаждения полимерных покрытий (частота 13.56 МГц, мощность 500 Вт, рабочий цикл 5%, рабочее расстояние 8 см, рабочее давление 4 Па) из газовой смеси CO₂/C₂H₄/Ar. Установлено, что в составе осаждаемых покрытий количество сложноэфирных/карбоксильных групп варьируется в диапазоне 2-12% в зависимости от соотношения потоков реагирующих газов (CO₂ к C₂H₄), при это вклад реакционноспособных карбоксильных групп составляет 0.1-0.8%. Установлено, что растворение полимерного слоя происходит в результате гидролиза сложноэфирных групп. Скорость гидролиза зависит от кислотности среды, что позволяет контролировать скорость высвобождения лекарственного агента и длительность терапевтического воздействия. Для получения стабильных покрытий с содержанием карбоксильных групп на уровне 0.3% было установлено соотношение потоков реагирующих газов CO₂ к C₂H₄ как 10.3:16 см³/мин, соответственно. Оптимизированы технологические режимы осаждения покрытий при плазменной полимеризации CO₂/C₂H₄ смеси на поверхность ПКЛ волокон с толщиной осаждаемого слоя 30 нм (время обработки 3 мин). Осаждение карбоксилсодержащего полимера на поверхность волокон приводило к уменьшению краевого угла смачивания с 134° (ПКЛ) до 45° (ПКЛ-COOH).
3. Оптимизированы технологические режимы магнетронного распыления композиционной мишени TiC+10%Ca₃(PO₄)₂ для формирования покрытий на поверхности ПКЛ нановолокон с сохранением их структуры. Установлено, что состав полученного покрытия содержит карбидные, нитридные и оксидные связи титана и аналогичен составу биоактивных покрытий TiCaPCON, используемых для модификации титановых

имплантатов. Осаждение биоактивного многокомпонентного покрытия на поверхность волокон приводило к уменьшению краевого угла смачивания с 134° (ПКЛ) до 34° (ПКЛ-TiCaPCON).

4. Показана биоактивность волокон ПКЛ-COON и ПКЛ-TiCaPCON. Биоактивность оценивалась двумя альтернативными методами: 1) путем выдержки в растворе, моделирующем внутреннюю среду организма (SBF) с последующим анализом изменений структуры и химии поверхности, 2) по активности щелочной фосфатазы. Установлено, что при выдержке в SBF на поверхности модифицированных образцов формируются Са-содержащие наночастицы, что свидетельствует о их биоактивности. Активность щелочной фосфатазы выросла в 2 раза для ПКЛ-TiCaPCON и в 3 раза для ПКЛ-COON по сравнению с необработанными ПКЛ волокнами. Показана высокая биосовместимость модифицированных волокон: ПКЛ-COON волокна обладают высокой адгезией и большой площадью распластывания эпителиальных клеток, что способствует регенерации мягких тканей, в то время ПКЛ-TiCaPCON волокна проявляют высокую адгезию и стимулируют пролиферацию остеобластных клеток, что демонстрирует потенциал применения в костной регенерации. Модифицированные волокна не оказывают цитотоксического эффекта в отношении обеих тестируемых линий клеток.

5. Показано, что аминогруппы гентамицина взаимодействуют с карбоксильными группами плазменно-модифицированных ПКЛ волокон за счет электростатических и ковалентных связей. Методом РФЭС показана высокая стабильность поверхностно-иммобилизованного гентамицина, вне зависимости от типа связи, который сохраняется на поверхности образцов после их выдержки в воде при 37°C в течение 48 ч. Установлено, что количество иммобилизованного гентамицина, определенное по количеству его полного выхода методом спектрофотометрии, зависит от типа связи и составляет 345 ± 15 (ионная связь) и 195 ± 11 мкг/мл (ковалентная связь). Показано, что в зависимости от типа связи, можно регулировать количество сорбированного гентамицина и скорость его выхода. Ковалентное присоединение антибиотика обеспечивает более равномерный его выход на протяжении 3 дней. Были исследованы антибактериальные свойства полученных материалов в отношении различных штаммов кишечной палочки (*E. coli*), обладающих различной минимальной ингибиторной концентрацией (МИК) к гентамицину. Показано, что размер зоны ингибирования коррелирует с МИК, при этом образцы с ковалентно-связанным гентамицином (ПКЛ-ГМ_{ков}), в отличие от электростатически связанного гентамицина (ПКЛ-ГМ_{ион}) демонстрируют пролонгированный антибактериальный эффект после выдержки в воде в течение 48 ч. Была показана высокая биосовместимость образцов

в отношении эпителиальных клеток IAR-2.

6. Показано, что ионы Ag^+ , введенные в состав покрытий TiCaPCON методом ионной имплантации (ИИ), не влияют на структуру нановолокон ПКЛ. С увеличением времени ИИ (4, 10 и 15 мин) концентрация Ag на поверхности, детектируемая методом РФЭС, снижалась. На основе результатов теоретического моделирования это объясняется тем, что большая часть атомов Ag находится в глубине образца. Методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой установлено, что кинетика выхода Ag в физиологический раствор (ФР) зависит от времени ИИ. Линейная скорость выхода Ag в ФР наблюдалась после ИИ в течение 10 и 14 мин, что связано с постепенным диффузионным выходом Ag в течение 7 дней. При краткосрочной обработке (4 мин) наблюдался выход Ag^+ ионов на уровне 12 мкг/л в течение первых 24 часов, после чего скорость выхода ионов Ag^+ постепенно снижалась и соответствовала 1-2 мкг/л/день. Показано локальное антибактериальное действие образцов ПКЛ-TiCaPCON-Ag1 (4 мин) в отношении патогенов *N. crassa* wt987, *N. crassa* nit 6, *N. crassa* nit 2, *E. coli* U20, *S. aureus* 839, *B. anthracis* IV.

7. Показано, что плазмохимическое осаждение карбоксил-содержащего полимерного слоя на поверхность ПКЛ волокон приводит к равномерному распределению наночастиц $\text{Ag}_2\text{O}/\text{ZnO}$, при этом получаемые материалы показали стабильность в воде. Образцы ПКЛ-Ag демонстрирует 100% подавление планктонных бактериальных клеток, и полностью препятствуют росту биопленок штаммов: *E. coli* U20, *S. aureus* MW2, *C. auris* CBS10913, *C. parapsilosis* ATCC90018, *C. albicans* ATCC90028. Образцы ПКЛ-ZnO полностью ингибируют штаммы *N. crassa*, *E. coli* U20 и *S. aureus* CSA154, и приводит к существенному ингибированию штамма *C. parapsilosis* ATCC90018 (снижение численности КОЕ на 2 порядка). Показано, что в первые сутки материалы демонстрируют высокий выход бактерицидных ионов Ag^+ и Zn^{+2} (900 и 1200 мкг/л $\times$ см², соответственно). Высокая эффективность материалов в отношении широкого спектра патогенов открывает хорошие перспективы для создания самоочищающихся фильтрующих материалов для защиты органов дыхания.

8. Биологические испытания, проведенные в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии, Московском Государственном Университете им. М.В. Ломоносова и Научно-исследовательском медицинском центре онкологии имени Н.Н. Блохина, показали, что поверхностная модификация ультратонких волокон ПКЛ приводят к повышению биосовместимости и биоактивности в отношении клеток остеобластов и эпителиальных клеток. Введение антибактериальных компонентов

приводит к выраженному антимикробному эффекту в отношении широкого спектра патогенов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Murray, C.J.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet* 2022, 399, 629–655, doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
2. Ntrivala, M.A.; Pitsavas, A.C.; Lazaridou, K.; Baziakou, Z.; Karavasili, D.; Papadimitriou, M.; Ntagkopoulou, C.; Balla, E.; Bikiaris, D.N. Polycaprolactone (PCL): The Biodegradable Polyester Shaping the Future of Materials – a Review on Synthesis, Properties, Biodegradation, Applications and Future Perspectives. *Eur Polym J* 2025, 234, 114033, doi:10.1016/j.eurpolymj.2025.114033.
3. Rahimkhoei, V.; Padervand, M.; Hedayat, M.; Seidi, F.; Dawi, E.A.; Akbari, A. Biomedical Applications of Electrospun Polycaprolactone-Based Carbohydrate Polymers: A Review. *Int J Biol Macromol* 2023, 253, 126642, doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.126642.
4. Cloutier, M.; Mantovani, D.; Rosei, F. Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities. *Trends Biotechnol* 2015, 33, 637–652, doi:10.1016/j.tibtech.2015.09.002.
5. Kulkarni, D.; Prabhanjan, G.; Jayashri, M.; Harshad, K.; and Panzade, P. Electrospun Nanofibers: A Promising Paradigm for Biomedical Applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2025, 74, 403–423, doi:10.1080/00914037.2024.2335173.
6. Wang, H.; Tian, Z.; Wang, L.; Wang, H.; Zhang, Y.; Shi, Z. Advancements, Functionalization Techniques, and Multifunctional Applications in Biomedical and Industrial Fields of Electrospun Pectin Nanofibers: A Review. *Int J Biol Macromol* 2025, 307, 141964, doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.141964.
7. Essa, W.; Yasin, S.; Saeed, I.; Ali, G. Nanofiber-Based Face Masks and Respirators as COVID-19 Protection: A Review. *Membranes (Basel)* 2021, 11, 250, doi:10.3390/membranes11040250.
8. Naragund, V.S.; Panda, P.K. Electrospun nanofiber-based respiratory face masks-a review. *Emergent Mater.* 2022;5(2):261-278. doi: 10.1007/s42247-022-00350-6.
9. Bhowmick, D.; Shipu, I.U. Advances in Nanofiber Technology for Biomedical Application: A Review. *World Journal of Advanced Research and Reviews* 2024, 22, 1908–1919, doi:10.30574/wjarr.2024.22.1.1337.
10. Shariatzadeh, F.J.; Currie, S.; Logsetty, S.; Spiwak, R.; Liu, S. Enhancing Wound Healing and Minimizing Scarring: A Comprehensive Review of Nanofiber Technology in Wound Dressings. *Prog Mater Sci* 2025, 147, 101350, doi:10.1016/j.pmatsci.2024.101350.
11. Zhang, S.; Yang, W.; Gong, W.; Lu, Y.; Yu, D.G.; Liu, P. Recent Progress of Electrospun Nanofibers as Burning Dressings. *RSC Adv* 2024, 14, 14374–14391, doi:10.1039/D4RA01514B.
12. Yang, Y.; Du, Y.; Zhang, J.; Zhang, H.; Guo, B. Structural and Functional Design of Electrospun Nanofibers for Hemostasis and Wound Healing. *Advanced Fiber Materials* 2022, 4, 1027–1057, doi:10.1007/s42765-022-00178-z.
13. Nie, J.; Sun, B.; Jiao, T.; Liao, J.; Zhang, M.; Yang, R.; Li, Y. Biodegradable Air Filter with Electrospun Composite Nanofibers and Cellulose Fibers Dual Network: Enhanced Electrostatic Adsorption, Humidity Resistance, and Extended Service Life. *J Hazard Mater* 2025, 489, 137557, doi:10.1016/j.jhazmat.2025.137557.
14. Hiwrale, A.; Bharati, S.; Pingale, P.; Rajput, A. Nanofibers: A Current Era in Drug Delivery System. *Heliyon* 2023, 9, 18917, doi:10.1016/j.heliyon.2023.e18917.

15. Torres-Martinez, E.J.; Cornejo Bravo, J.M.; Serrano Medina, A.; Pérez González, G.L.; Villarreal Gómez, L.J. A Summary of Electrospun Nanofibers as Drug Delivery System: Drugs Loaded and Biopolymers Used as Matrices. *Curr Drug Deliv* 2018, 15, 1360–1374, doi:10.2174/1567201815666180723114326.
16. Arribas, P.; García-Payo, M.C.; Khayet, M.; Gil, L. Improved Antifouling Performance of Polyester Thin Film Nanofiber Composite Membranes Prepared by Interfacial Polymerization. *J Memb Sci* 2020, 598, doi:10.1016/j.memsci.2019.117774.
17. Jao, D.; Beachley, V.Z. Continuous Dual-Track Fabrication of Polymer Micro-/Nanofibers Based on Direct Drawing. *ACS Macro Lett* 2019, 8, 588–595, doi:10.1021/acsmacrolett.9b00167.
18. Ciftci, D.; Ubeyitogullari, A.; Huerta, R.R.; Ciftci, O.N.; Flores, R.A.; Saldaña, M.D.A. Lupin Hull Cellulose Nanofiber Aerogel Preparation by Supercritical CO₂ and Freeze Drying. *Journal of Supercritical Fluids* 2017, 127, 137–145, doi:10.1016/j.supflu.2017.04.002.
19. Yang, L.; Niu, C.; Cao, X.; Wang, Y.; Zhu, Z.; Sun, H.; Liang, W.; Li, J.; Li, A. Mechanically Robust Conjugated Microporous Polymer Membranes Prepared Using Polyvinylpyrrolidone (PVP) Electrospun Nanofibers as a Template for Efficient PM Capture. *J Colloid Interface Sci* 2023, 637, 305–316, doi:10.1016/j.jcis.2023.01.059.
20. Sun, Y.; Li, X.; Zhao, M.; Chen, Y.; Xu, Y.; Wang, K.; Bian, S.; Jiang, Q.; Fan, Y.; Zhang, X. Bioinspired Supramolecular Nanofiber Hydrogel through Self-Assembly of Biphenyl-Tripeptide for Tissue Engineering. *Bioact Mater* 2022, 8, 396–408, doi:10.1016/j.bioactmat.2021.05.054.
21. Satish, S.; Priya, R. A Mini Review on Centrifugal Spinning Technique for Production of Nanofibers and Its Applications in Drug Delivery. *Journal of medical pharmaceutical and allied sciences* 2022, 11, 4349–4352, doi:10.55522/jmpas.v11i1.2176.
22. Xue, J.; Wu, T.; Dai, Y.; Xia, Y. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chem Rev* 2019, 119, 5298–5415, doi:10.1021/acs.chemrev.8b00593.
23. Ahmadi Bonakdar, M.; Rodrigue, D. Electrospinning: Processes, Structures, and Materials. *Macromol* 2024, 4, 58–103, doi:10.3390/macromol4010004.
24. Ghajarieh, A.; Habibi, S.; Talebian, A. Biomedical Applications of Nanofibers. *Russian Journal of Applied Chemistry* 2021, 94, 847–872, doi:10.1002/9781119650294.ch20.
25. Li, X.; Teng, S.; Xu, X.; Wang, H.; Dong, F.; Zhuang, X.; Cheng, B. Solution Blowing of Polyacrylonitrile Nanofiber Mats Containing Fluoropolymer for Protective Applications. *Fibers and Polymers* 2018, 19, 775–781, doi:10.1007/s12221-018-7912-x.
26. Skaria, S.D.; Smaldone, G.C. Respiratory Source Control Using Surgical Masks with Nanofiber Media. *Annals of Occupational Hygiene* 2014, 58, 771–781, doi:10.1093/annhyg/meu023.
27. Zhao, X.; Bai, Y.; Fan, G.; Guo, H.; Shi, P.; Cui, W.; Jin, X.; Liu, Y.; Wang, R.; He, J. Large-Scale Fabrication of 3D Gradient Hierarchical Fibrous Filter Materials with Micro-Submicro-Nanofibers for Efficient and Long-Duration Air Filtration. *Sep Purif Technol* 2025, 362, 131867, doi:10.1016/j.seppur.2025.131867.
28. Wang, C. Sen; Otani, Y. Removal of Nanoparticles from Gas Streams by Fibrous Filters: A Review. *Ind Eng Chem Res* 2013, 52, 5–17, doi:10.1021/ie300574m.
29. Cimini, A.; Imperi, E.; Picano, A.; Rossi, M. Electrospun Nanofibers for Medical Face Mask with Protection Capabilities against Viruses: State of the Art and Perspective for Industrial Scale-Up. *Appl Mater Today* 2023, 32, 101833, doi:10.1016/j.apmt.2023.101833.

30. Lee, K.S.; Hasolli, N.; Jeon, S.M.; Lee, J.R.; Kim, K.D.; Park, Y.O.; Hwang, J. Filter Layer Structure Effect on the Most Penetrating Particle Size of Multilayered Flat Sheet Filter. *Powder Technol* 2019, 344, 270–277, doi:10.1016/j.powtec.2018.12.041.
31. Bulejko, P.; Křištof, O.; Dohnal, M.; Svěrák, T. Fine/Ultrafine Particle Air Filtration and Aerosol Loading of Hollow-Fiber Membranes: A Comparison of Mathematical Models for the Most Penetrating Particle Size and Dimensionless Permeability with Experimental Data. *J Memb Sci* 2019, 592, 117393, doi:10.1016/j.memsci.2019.117393.
32. Jung, C.H.; Park, H.S.; Kim, Y.P. Short Communication Theoretical Study for the Most Penetrating Particle Size of Dust-Loaded Fiber Filters. *Sep Purif Technol* 2013, 116, 248–252, doi:10.1016/j.seppur.2013.05.045.
33. Report of World Health Organization Health effects of particulate matter: policy implications for countries in eastern Europe, Caucasus and central Asia; 2013; <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/344854/9789289000017-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
34. Zaheer, J.; Jeon, J.; Lee, S.-B.; Kim, J.S. Effect of Particulate Matter on Human Health, Prevention, and Imaging Using PET or SPECT. *Progress in Medical Physics* 2018, 29, 81, doi:10.14316/pmp.2018.29.3.81.
35. Kim, K.H.; Kabir, E.; Kabir, S. A Review on the Human Health Impact of Airborne Particulate Matter. *Environ Int* 2015, 74, 136–143, doi:10.1016/j.envint.2014.10.005.
36. Sanyal, A.; Sinha-Ray, S. Ultrafine PVDF Nanofibers for Filtration of Air-Borne Particulate Matters: A Comprehensive Review. *Polymers (Basel)* 2021, 13, doi:10.3390/polym13111864.
37. Louten, J. Virus Structure and Classification. Book: In *Essential Human Virology*, Ch 2, Elsevier 2016, 19–29, doi:10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8.
38. Bian, Y.; Wang, S.; Zhang, L.; Chen, C. Influence of Fiber Diameter, Filter Thickness, and Packing Density on PM_{2.5} Removal Efficiency of Electrospun Nanofiber Air Filters for Indoor Applications. *Build Environ* 2020, 170, 106628, doi:10.1016/j.buildenv.2019.106628.
39. Liu, Y.P.; Deng, Y.; Jiang, Z.X. Effect of Nanofiber Diameter on Filtration Efficiency. *Advanced Materials Research* 2012, 560–561, 737–741, doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.560-561.737.
40. Zhang, X.; Fan, Y.S.; Tian, G.J.; Wang, H.; Zhang, H.L.; Xie, W. Influence of Fiber Diameter on Filtration Performance of Polyester Fibers. *Thermal Science* 2019, 23, 2291–2296, doi:10.2298/TSCI1904291Z.
41. Leung, W.W.F.; Hung, C.H.; Yuen, P.T. Effect of Face Velocity, Nanofiber Packing Density and Thickness on Filtration Performance of Filters with Nanofibers Coated on a Substrate. *Sep Purif Technol* 2010, 71, 30–37, doi:10.1016/j.seppur.2009.10.017.
42. Wang, J.; Kim, S.C.; Pui, D.Y.H. Investigation of the Figure of Merit for Filters with a Single Nanofiber Layer on a Substrate. *J Aerosol Sci* 2008, 39, 323–334, doi:10.1016/j.jaerosci.2007.12.003.
43. Khezrian, M.; Jafari, A.; Mohraz, M.H. Enhancing the Filtration Performance of Common Substrates Used in the Covid-19 Respiratory Protection Equipment with Nanofiber Coatings. *Heliyon* 2025, 11, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e41580.
44. Thomberg, T.; Bulgarin, H.; Lust, A.; Nerut, J.; Koppel, M.; Romann, T.; Palm, R.; Månsson, M.; Flores March, N.M.; Junninen, H.; et al. The Anti SARS-CoV-2 Activity of Nanofibrous Filter

- Materials Activated with Metal Clusters. *Atmos Environ X* 2023, 17, 100212. doi: 10.1016/j.aeaoa.2023.100212.
45. Gan, X.; Lin, T.; Jiang, F.; Zhang, X. Impacts on Characteristics and Effluent Safety of PVDF Ultrafiltration Membranes Aged by Different Chemical Cleaning Types. *J Memb Sci* 2021, 640, 119770, doi:10.1016/j.memsci.2021.119770.
46. Kye, H.; Kim, J.; Ju, S.; Lee, J.; Lim, C.; Yoon, Y. Microplastics in Water Systems: A Review of Their Impacts on the Environment and Their Potential Hazards. *Heliyon* 2023, 9(3), 14359, doi:10.1016/j.heliyon.2023.e14359.
47. Queiroz, L.G.; do Prado, C.C.A.; de Oliveira, P.F.M.; Valezi, D.F.; Cecconi Portes, M.; Rocha de Moraes, B.; Ando, R.A.; Vicente, E.; de Paiva, T.C.B.; Pompêo, M.; et al. The Toxicity of Poly(Acrylonitrile-Styrene-Butadiene) Microplastics toward *Hyalella Azteca* Is Associated with Biofragmentation and Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol* 2025, 38(1), 91-101. doi: 10.1021/acs.chemrestox.4c00300.
48. Bian, Y.; Zhang, C.; Wang, H.; Cao, Q. Degradable Nanofiber for Eco-Friendly Air Filtration: Progress and Perspectives. *Sep Purif Technol* 2023, 306, 122642, doi:10.1016/j.seppur.2022.122642.
49. Shao, Z.; Wang, Q.; Gui, Z.; Shen, R.; Chen, R.; Liu, Y.; Zheng, G. Electrospun Bimodal Nanofibrous Membranes for High-Performance, Multifunctional, and Light-Weight Air Filtration: A Review. *Sep Purif Technol* 2025, 358, 130417, doi: 10.1016/j.seppur.2024.130417.
50. Sisson, A.L.; Ekinici, D.; Lendlein, A. The Contemporary Role of ϵ -Caprolactone Chemistry to Create Advanced Polymer Architectures. *Polymer (Guildf)* 2013, 54, 4333–4350, doi: 10.1016/j.polymer.2013.04.045.
51. Banimohamad-Shotorbani, B.; Rahmani Del Bakhshayesh, A.; Mehdipour, A.; Jarolmasjed, S.; Shafaei, H. The Efficiency of PCL/HAp Electrospun Nanofibers in Bone Regeneration: A Review. *J Med Eng Technol* 2021, 45, 511–531, doi:10.1080/03091902.2021.1893396.
52. Tian, G.; Huang, Z.; Wang, H.; Cui, C.; Zhang, Y. Polycaprolactone Nanofiber Membrane Modified with Halloysite and ZnO for Anti-Bacterial and Air Filtration. *Appl Clay Sci* 2022, 223, 106512, doi:10.1016/j.clay.2022.106512.
53. Dubey, P.; Bhushan, B.; Sachdev, A.; Matai, I.; Uday Kumar, S.; Gopinath, P. Silver-Nanoparticle-Incorporated Composite Nanofibers for Potential Wound-Dressing Applications. *J Appl Polym Sci* 2015, 132, 42473, doi:10.1002/app.42473.
54. Manakhov, A.M.; Permyakova, E.S.; Sitnikova, N.A.; Tsygankova, A.R.; Alekseev, A.Y.; Solomatina, M. V.; Baidyshev, V.S.; Popov, Z.I.; Blahová, L.; Eliáš, M.; et al. Biodegradable Nanohybrid Materials as Candidates for Self-Sanitizing Filters Aimed at Protection from SARS-CoV-2 in Public Areas. *Molecules* 2022, 27(4), 1333, doi:10.3390/molecules27041333.
55. Liu, Y.; Li, S.; Lan, W.; Hossen, M.A.; Qin, W.; Lee, K. Electrospun Antibacterial and Antiviral Poly(ϵ -Caprolactone)/Zein/Ag Bead-on-String Membranes and Its Application in Air Filtration. *Mater Today Adv* 2021, 12, 100173, doi:https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2021.100173.
56. de Moura Junior, C.F.; Ochi, D.; Calais, G.B.; Rocha Neto, J.B.M.; d'Ávila, M.A.; Beppu, M.M. Electrospun Nonwoven Fabric of Poly(ϵ -Caprolactone)/n-Phosphonium Chitosan for Antiviral Applications: Fabrication, Characterization, and Potential Efficacy. *Int J Biol Macromol* 2024, 278, 134861, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.134861.
57. Wani, T.; Khan, R.; Rather, A.; Rafiq, M.; Majeed, S.; Khan, H.; Sheikh, F. Novel Bioactive Multi-Layered Nanofibers Composed of Poly(ϵ -Caprolactone) and Poly(Vinyl Alcohol) Loaded

- with Zoledronic Acid and Silver Nanoparticles. *Bionanoscience* 2025, 15, 264, doi:10.1007/s12668-025-01886-7.
58. Costa, S.M.; Pacheco, L.; Antunes, W.; Vieira, R.; Bem, N.; Teixeira, P.; Fangueiro, R.; Ferreira, D.P. Antibacterial and Biodegradable Electrospun Filtering Membranes for Facemasks: An Attempt to Reduce Disposable Masks Use. *Applied Sciences (Switzerland)* 2022, 12(1), 67, doi:10.3390/app12010067.
59. Kouhbanani, M.A.J.; Mosleh-Shirazi, S.; Beheshtkhoo, N.; Kasaei, S.R.; Nekouian, S.; Alshehry, S.; Kamyab, H.; Chelliapan, S.; Ali, M.A.; Amani, A.M. Investigation through the Antimicrobial Activity of Electrospun PCL Nanofiber Mats with Green Synthesized Ag–Fe Nanoparticles. *J Drug Deliv Sci Technol* 2023, 85, 104541, doi:10.1016/j.jddst.2023.104541.
60. Khunová, V.; Kováčová, M.; Olejníková, P.; Ondráš, F.; Špitalský, Z.; Ghosal, K.; Berkeš, D. Antibacterial Electrospun Polycaprolactone Nanofibers Reinforced by Halloysite Nanotubes for Tissue Engineering. *Polymers (Basel)* 2022, 14(4), 746, doi:10.3390/polym14040746.
61. Fallah, M.; Bahrami, S.H.; Ranjbar-Mohammadi, M. Fabrication and Characterization of PCL/Gelatin/Curcumin Nanofibers and Their Antibacterial Properties. *Journal of Industrial Textiles* 2016, 46, 562–577, doi:10.1177/1528083715594978.
62. Augustine, R.; Malik, H.N.; Singhal, D.K.; Mukherjee, A.; Malakar, D.; Kalarikkal, N.; Thomas, S. Electrospun Polycaprolactone/ZnO Nanocomposite Membranes as Biomaterials with Antibacterial and Cell Adhesion Properties. *Journal of Polymer Research* 2014, 21, 347, doi:10.1007/s10965-013-0347-6.
63. Bao, J.; Yang, B.; Sun, Y.; Zu, Y.; Deng, Y. A Berberine-Loaded Electrospun Poly-(ϵ -Caprolactone) Nanofibrous Membrane with Hemostatic Potential and Antimicrobial Property for Wound Dressing. *J Biomed Nanotechnol* 2013, 9, 1173–1180, doi:10.1166/jbn.2013.1629.
64. de Moraes Segundo, J.D.P.; Calais, G.B.; Constantino, J.S.F.; de Moura Junior, C.F.; de Souza, F.F.P.; Andrade, F.K.; de Moraes, M.O.S.; d'Ávila, M.A.; Tsukamoto, J.; Arns, C.W.; et al. Copper-PCL/PVP Virucidal Nanofibers against Coronavirus Produced by Electrospinning Technology. *Polym Adv Technol* 2024, 35, doi:10.1002/pat.6225.
65. Fujihara, K.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. Guided Bone Regeneration Membrane Made of Polycaprolactone/Calcium Carbonate Composite Nano-Fibers. *Biomaterials* 2005, 26, 4139–4147, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.014.
66. Krishnan, S.N.; Saravanan, S.; Ambigapathi, M.; Ramyakrishna, B.; Selvamurugan, N. Enhanced Osteoblast Adhesion on Polymeric Nano-Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J Biomed Nanotechnol* 2011, 7, 238–244, doi:10.1166/jbn.2011.1283.
67. Zhao, T.; Zhang, J.; Gao, X.; Yuan, D.; Gu, Z.; Xu, Y. Electrospun Nanofibers for Bone Regeneration: From Biomimetic Composition, Structure to Function. *J Mater Chem B* 2022, 10, 6078–6106, doi:10.1039/D2TB01182D.
68. Bahney, C.S.; Zondervan, R.L.; Allison, P.; Theologis, A.; Ashley, J.W.; Ahn, J.; Miclau, T.; Marcucio, R.S.; Hankenson, K.D. Cellular Biology of Fracture Healing. *Journal of Orthopaedic Research* 2019, 37, 35–50, doi:10.1002/jor.24170.
69. Khorshidi, S.; Solouk, A.; Mirzadeh, H.; Mazinani, S.; Lagaron, J.M.; Sharifi, S.; Ramakrishna, S. A Review of Key Challenges of Electrospun Scaffolds for Tissue-Engineering Applications. *J Tissue Eng Regen Med* 2016, 10(9), 715–738, doi: 10.1002/term.1978.
70. Elsdale, T.; Bard, J. Collagen Substrata for Studies on Cell Behavior. *J Cell Biol* 1972, 54, 626–637, doi:10.1083/jcb.54.3.626.

71. He, L.; Liao, S.; Quan, D.; Ma, K.; Chan, C.; Ramakrishna, S.; Lu, J. Synergistic Effects of Electrospun PLLA Fiber Dimension and Pattern on Neonatal Mouse Cerebellum C17.2 Stem Cells. *Acta Biomater* 2010, 6, 2960–2969, doi:10.1016/j.actbio.2010.02.039.
72. Serim, T.M.; Amasya, G.; Eren-Böncü, T.; Şengel-Türk, C.T.; Özdemir, A.N. Electrospun Nanofibers: Building Blocks for the Repair of Bone Tissue. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 2024, 15, 941–953, doi:10.3762/bjnano.15.77.
73. Wang, Y.; Yue, G.; Bai, T.; Liu, F.; Wang, N.; Bai, J.; Kong, L.; Zhao, Y. Hierarchical Assembly of Electrospun Nanofibers for the next Generation Tissue Repairing Materials. *Sustainable Materials and Technologies* 2025, 44, 01355, doi:10.1016/j.susmat.2025.e01355.
74. Liang, W.; Zhou, C.; Liu, X.; Xie, Q.; Xia, L.; Liu, L.; Bao, W.; Lin, H.; Xiong, X.; Zhang, H.; et al. Current Status of Nano-Embedded Growth Factors and Stem Cells Delivery to Bone for Targeted Repair and Regeneration. *J Orthop Translat* 2025, 50, 257–273, doi:10.1016/j.jot.2024.12.006.
75. Salehi, S.; Ghomi, H.; Hassanzadeh-Tabrizi, S.A.; Koupaei, N.; Khodaei, M. Antibacterial and Osteogenic Properties of Chitosan-Polyethylene Glycol Nanofibre-Coated 3D Printed Scaffold with Vancomycin and Insulin-like Growth Factor-1 Release for Bone Repair. *Int J Biol Macromol* 2025, 298, 139883, doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.139883.
76. Zhan, Z.; Li, R.; Wu, Y.; Shen, X.; Fu, D.; Han, H.; Jing, P.; Li, B.; Han, F.; Meng, B. Biomimetic Periosteum-Bone Scaffolds with Codelivery of BMP-2 and PDGF-BB for Skull Repair. *Bone* 2025, 190, 117315 doi:10.1016/j.bone.2024.117315.
77. Wang, M.; Dai, T.; Wang, W.; OuYang, J. BMP-2 Loaded Bioactive PLLA/PCL Blended Nanofibers for Synergistic Influences on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells via TGF- β /Smad2/3 Signaling Pathway. *J Drug Deliv Sci Technol* 2025, 105, 106639, doi: 10.1016/j.jddst.2025.106639.
78. Xiao, Y.; Qu, Y.; Hu, X.; Zhao, J.; Xu, S.; Zheng, L.; Liang, X. E7 Peptide Modified Poly(ϵ -Caprolactone)/Silk Fibroin/Octacalcium Phosphate Nanofiber Membranes with “Recruitment-Osteoinduction” Potentials for Effective Guided Bone Regeneration. *Int J Biol Macromol* 2025, 305, 140862, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.140862.
79. Zhang, Z.; Hu, J.; Ma, P.X. Nanofiber-Based Delivery of Bioactive Agents and Stem Cells to Bone Sites. *Adv Drug Deliv Rev* 2012, 64, 1129–1141, doi:10.1016/j.addr.2012.04.008.
80. Haider, A.; Gupta, K.C.; Kang, I.K. Morphological Effects of HA on the Cell Compatibility of Electrospun HA/PLGA Composite Nanofiber Scaffolds. *Biomed Res Int* 2014, 2014, 308306, doi:10.1155/2014/308306.
81. Bozdog, M.; Urek, F.; Cesur, S.; Sahin, A.; Gunduz, O. Bovine Serum Albumin (BSA)-Loaded Polyvinyl Alcohol (PVA) / Chitosan (CH) / Hydroxyapatite (HA) Electrospun Nanofibers for Bone Tissue Regeneration. *J Drug Deliv Sci Technol* 2025, 106, 106712, doi: 10.1016/j.jddst.2025.106712.
82. Fu, K.; Yang, L.-L.; Gao, N.; Liu, P.; Xue, B.; He, W.; Qiu, W.; Wen, X. Modified Five Times Simulated Body Fluid for Efficient Biomimetic Mineralization. *Heliyon* 2024, 10, 32850, doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e32850.
83. Guo, Y.; Lan, J.; Zhang, C.; Cao, M.; Cai, Q.; Yang, X. Mineralization on Polylactide/Gelatin Composite Nanofibers Using Simulated Body Fluid Containing Amino Acid. *Appl Surf Sci* 2015, 349, 538–548, doi:10.1016/j.apsusc.2015.05.047.

84. Nitta, S.; Komatsu, A.; Ishii, T.; Ohnishi, M.; Inoue, A.; Iwamoto, H. Fabrication and Characterization of Water-Dispersed Chitosan Nanofiber/Poly(Ethylene Glycol) Diacrylate/Calcium Phosphate-Based Porous Composites. *Carbohydr Polym* 2017, 174, 1034–1040, doi:10.1016/j.carbpol.2017.06.111.
85. Hadisi, Z.; Nourmohammadi, J.; Mohammadi, J. Composite of Porous Starch-Silk Fibroin Nanofiber-Calcium Phosphate for Bone Regeneration. *Ceram Int* 2015, 41(9), 10745–10754, doi:10.1016/j.ceramint.2015.05.010.
86. Jaiswal, A.; Kadam, S.; Soni, V.; Bellare, J. Improved Functionalization of Electrospun PLLA/Gelatin Scaffold by Alternate Soaking Method for Bone Tissue Engineering. *Appl Surf Sci* 2013, 268, 477–488, doi:10.1016/j.apsusc.2012.12.152.
87. Cai, Q.; Xu, Q.; Feng, Q.; Cao, X.; Yang, X.; Deng, X. Biomineralization of Electrospun Poly(l-Lactic Acid)/Gelatin Composite Fibrous Scaffold by Using a Supersaturated Simulated Body Fluid with Continuous CO₂ Bubbling. *Appl Surf Sci* 2011, 257, 10109–10118, doi:10.1016/j.apsusc.2011.06.157.
88. Okhrimenko, D.; Nissenbaum, J.; Andersson, M.; Olsson, M.; Stipp, S. Energies of the Adsorption of Functional Groups to Calcium Carbonate Polymorphs: The Importance of -OH and -COOH Groups. *Langmuir* 2013, 29(35), 11062–11073, doi:10.1021/la402305x.
89. Chen, Y.; Feng, Y.; Deveaux, J.G.; Masoud, M.A.; Chandra, F.S.; Chen, H.; Zhang, D.; Feng, L. Biomineralization Forming Process and Bio-Inspired Nanomaterials for Biomedical Application: A Review. *Minerals* 2019, 9(2), 68, doi:10.3390/min9020068.
90. Kim, H.-M.; Miyaji, F.; Kokubo, T.; Nakamura, T. Preparation of Bioactive Ti and Its Alloys via Simple Chemical Surface Treatment. *J Biomed Mater Res* 1996, 32(3), 409–417, doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199611)32:3<409::AID-JBM14>3.0.CO;2-B.
91. Todea, M.; Vulpoi, A.; Popa, C.; Berce, P.; Simon, S. Effect of Different Surface Treatments on Bioactivity of Porous Titanium Implants. *J Mater Sci Technol* 2019, 35, 418–426, doi:10.1016/j.jmst.2018.10.004.
92. Fu, K.; Yang, L.-L.; Gao, N.; Liu, P.; Xue, B.; He, W.; Qiu, W.; Wen, X. Modified Five Times Simulated Body Fluid for Efficient Biomimetic Mineralization. *Heliyon* 2024, 10, 32850, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e32850.
93. Yang, X.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Chen, J.; Wan, Q. The Application of Polycaprolactone in Three-Dimensional Printing Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel)* 2021, 13(16), 2754, doi:10.3390/polym13162754.
94. Georgopoulou, A.; Kaliva, M.; Vamvakaki, M.; Chatzinikolaidou, M. Osteogenic Potential of Pre-Osteoblastic Cells on a Chitosan-Graft-Polycaprolactone Copolymer. *Materials* 2018, 11(4), 490, doi:10.3390/ma11040490.
95. Schnell, E.; Klinkhammer, K.; Balzer, S.; Brook, G.; Klee, D.; Dalton, P.; Mey, J. Guidance of Glial Cell Migration and Axonal Growth on Electrospun Nanofibers of Poly-ε-Caprolactone and a Collagen/Poly-ε-Caprolactone Blend. *Biomaterials* 2007, 28, 3012–3025, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.03.009.
96. Park, S.A.; Lee, H.J.; Kim, S.Y.; Kim, K.S.; Jo, D.W.; Park, S.Y. Three-Dimensionally Printed Polycaprolactone/Beta-Tricalcium Phosphate Scaffold Was More Effective as an RhBMP-2 Carrier for New Bone Formation than Polycaprolactone Alone. *J Biomed Mater Res A* 2021, 109, 840–848, doi:10.1002/jbm.a.37075.

97. Venugopal, J.; Vadgama, P.; Sampath Kumar, T.S.; Ramakrishna, S. Biocomposite Nanofibres and Osteoblasts for Bone Tissue Engineering. *Nanotechnology* 2007, 18(5), 055101, doi:10.1088/0957-4484/18/5/055101.
98. Shin, M.; Yoshimoto, H.; Vacanti, J.P. In Vivo Bone Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells on a Novel Electrospun Nanofibrous Scaffold. *Tissue Eng* 2004, 10, 33–41, doi:10.1089/107632704322791673.
99. Jiang, J.; Wan, J.; Yu, X.; Yi, X.; Hu, W.; Gu, M.; Huo, J.; Dai, W.; Yao, H.; Wan, D.; et al. Biomimetic Patch with Gradient-Induced Regeneration for Tendon-Bone Interface to Repair Rotator Cuff Injury. *Chemical Engineering Journal* 2025, 506(1), 159985, doi:10.1016/j.cej.2025.159985.
100. Pishva, B.; Nourmohammadi, J.; Hesarak, S. Gallic Acid-Grafted Hybrid Strontium Fluoride/Polycaprolactone Nanocomposite Fibers for Bone Regeneration. *Prog Org Coat* 2022, 170, 106976, doi:10.1016/j.porgcoat.2022.106976.
101. Xu, W.; Gao, X.; Zhang, M.; Jiang, Z.; Xu, X.; Huang, L.; Yao, H.; Zhang, Y.; Tong, X.; Li, Y.; et al. Electrospun Polycaprolactone-Chitosan Nanofibers on a Zinc Mesh as Biodegradable Guided Bone-Regeneration Membranes with Enhanced Mechanical, Antibacterial, and Osteogenic Properties for Alveolar Bone-Repair Applications. *Acta Biomater* 2024, 187, 434–450, doi:10.1016/j.actbio.2024.08.033.
102. Liu, R.; Pang, Y.; Xiao, T.; Zhang, S.; Liu, Y.; Min, Y. Multifunctional PCL Composite Nanofibers Reinforced with Lignin and ZIF-8 for the Treatment of Bone Defects. *Int J Biol Macromol* 2022, 218, 1–8, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.06.183.
103. Chen, Y.; Liu, J.; Dai, Z.; Hu, H.; Liu, Z.; Liu, W. Surface-Modified Electrospun Poly-ε-Caprolactone Incorporating ZnO NPs and QK Peptide to Repair Bone Defect via Osteogenesis, Angiogenesis and Antibacterial. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2025, 246, 114388, doi:10.1016/j.colsurfb.2024.114388.
104. He, X.; Huang, Z.; Liu, W.; Liu, Y.; Qian, H.; Lei, T.; Hua, L.; Hu, Y.; Zhang, Y.; Lei, P. Electrospun Polycaprolactone/Hydroxyapatite/ZnO Films as Potential Biomaterials for Application in Bone-Tendon Interface Repair. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2021, 204, 111825, doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111825.
105. Abdelaziz, D.; Hefnawy, A.; Al-Wakeel, E.; El-Fallal, A.; El-Sherbiny, I.M. New Biodegradable Nanoparticles-in-Nanofibers Based Membranes for Guided Periodontal Tissue and Bone Regeneration with Enhanced Antibacterial Activity. *J Adv Res* 2021, 28, 51–62, doi:10.1016/j.jare.2020.06.014.
106. Liu, W.; Zhang, K.; Nan, J.; Lei, P.; Sun, Y.; Hu, Y. Nano Artificial Periosteum PCL/Ta/ZnO Accelerates Repair of Periosteum via Antibacterial, Promoting Vascularization and Osteogenesis. *Biomaterials Advances* 2023, 154, 213624, doi:10.1016/j.bioadv.2023.213624.
107. Pignet, A.-L.; Schellnegger, M.; Hecker, A.; Kamolz, L.-P.; Kotzbeck, P. Modeling Wound Chronicity In Vivo: The Translational Challenge to Capture the Complexity of Chronic Wounds. *Journal of Investigative Dermatology* 2024, 144, 1454–1470, doi: 10.1016/j.jid.2023.11.024.
108. Sengul, T.; Kirkland-Kyhn, H.; Karadag, A. Chronic Wounds and Dressings: An Overview of Management and Effectiveness. *Nursing Clinics of North America* 2025, 60, 1–13, doi: 10.1016/j.cnur.2024.08.008.

109. Mihai, M.M.; Bălăceanu-Gurău, B.; Ion, A.; Holban, A.M.; Gurău, C.D.; Popescu, M.N.; Beiu, C.; Popa, L.G.; Popa, M.I.; Dragomirescu, C.C.; et al. Host–Microbiome Crosstalk in Chronic Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25(9), 4629, doi:10.3390/ijms25094629
110. Kumar, S.; Mahato, R.P.; Ch, S.; Kumbham, S. Current Strategies against Multidrug-Resistant *Staphylococcus Aureus* and Advances toward Future Therapy. *Microbe (Netherlands)* 2025, 6, 100281, doi:10.1016/j.microb.2025.100281.
111. Macesic, N.; Uhlemann, A.-C.; Peleg, A.Y. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Lancet* 2025 405(10474), 257-272, doi: 10.1016/S0140-6736(24)02081-6
112. Martinengo, L.; Olsson, M.; Bajpai, R.; Soljak, M.; Upton, Z.; Schmidtchen, A.; Car, J.; Järbrink, K. Prevalence of Chronic Wounds in the General Population: Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Ann Epidemiol* 2019, 29, 8–15, doi: 10.1016/j.annepidem.2018.10.005.
113. Zhu, X.; Olsson, M.M.; Bajpai, R.; Järbrink, K.; Tang, W.E.; Car, J. Health-Related Quality of Life and Chronic Wound Characteristics among Patients with Chronic Wounds Treated in Primary Care: A Cross-Sectional Study in Singapore. *Int Wound J* 2022, 19, 1121–1132, doi:10.1111/iwj.13708.
114. Olsson, M.; Järbrink, K.; Divakar, U.; Bajpai, R.; Upton, Z.; Schmidtchen, A.; Car, J. The Humanistic and Economic Burden of Chronic Wounds: A Systematic Review. *Wound Repair and Regeneration* 2019, 27, 114–125, doi:10.1111/wrr.12683.
115. Lu, X.; Zhou, L.; Song, W. Recent Progress of Electrospun Nanofiber Dressing in the Promotion of Wound Healing. *Polymers* 2024, 16(18), 2596, doi:10.3390/polym16182596
116. Christen, M.O.; Vercesi, F. Polycaprolactone: How a Well-Known and Futuristic Polymer Has Become an Innovative Collagen-Stimulator in Esthetics. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2020, 13, 31–48, doi: 10.2147/CCID.S229054.
117. Chaierwut, S.; Ekabutr, P.; Chuysinuan, P.; Chanamuangkon, T.; Supaphol, P. Surface Immobilization of PCL Electrospun Nanofibers with Pexiganan for Wound Dressing. *Journal of Polymer Research* 2021, 28, 344, doi:10.1007/s10965-021-02669-w.
118. Nejaddehbashi, F.; Hashemitabar, M.; Bayati, V.; Moghimipour, E.; Movaffagh, J.; Orazizadeh, M.; Abbaspour, M. Incorporation of Silver Sulfadiazine into an Electrospun Composite of Polycaprolactone as an Antibacterial Scaffold for Wound Healing in Rats. *Cell J* 2020, 21, 379–390, doi:10.22074/cellj.2020.6341.
119. Fahimirad, S.; Abtahi, H.; Satei, P.; Ghaznavi-Rad, E.; Moslehi, M.; Ganji, A. Wound Healing Performance of PCL/Chitosan Based Electrospun Nanofiber Electrosprayed with Curcumin Loaded Chitosan Nanoparticles. *Carbohydr Polym* 2021, 259, 117640, doi:10.1016/j.carbpol.2021.117640.
120. Lan, X.; Liu, Y.; Wang, Y.; Tian, F.; Miao, X.; Wang, H.; Tang, Y. Coaxial Electrospun PVA/PCL Nanofibers with Dual Release of Tea Polyphenols and ϵ -Poly (L-Lysine) as Antioxidant and Antibacterial Wound Dressing Materials. *Int J Pharm* 2021, 601, 120525, doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120525.
121. Cui, C.; Sun, S.; Li, X.; Chen, S.; Wu, S.; Zhou, F.; Ma, J. Optimizing the Chitosan-PCL Based Membranes with Random/Aligned Fiber Structure for Controlled Ciprofloxacin Delivery and Wound Healing. *Int J Biol Macromol* 2022, 205, 500–510, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.02.118.

122. Li, R.; Cheng, Z.; Yu, X.; Wang, S.; Han, Z.; Kang, L. Preparation of Antibacterial PCL/PVP-AgNP Janus Nanofibers by Uniaxial Electrospinning. *Mater Lett* 2019, 254, 206–209, doi:10.1016/j.matlet.2019.07.075.
123. Bui, H.T.; Chung, O.H.; Cruz, J. Dela; Park, J.S. Fabrication and Characterization of Electrospun Curcumin-Loaded Polycaprolactone-Polyethylene Glycol Nanofibers for Enhanced Wound Healing. *Macromol Res* 2014, 22, 1288–1296, doi:10.1007/s13233-014-2179-6.
124. Zhao, Y.; Liu, Y.; Tian, C.; Liu, Z.; Wu, K.; Zhang, C.; Han, X. Construction of Antibacterial Photothermal PCL/AgNPs/BP Nanofibers for Infected Wound Healing. *Mater Des* 2023, 226, 111670, doi:10.1016/j.matdes.2023.111670.
125. Zhang, Y. Sen; Ke, S.; Hu, X.; Wang, S.Y.; Peng, W.Q.; Qian, X.H.; Tian, L.H.; Wu, H.J.; Li, B.H.; Zeng, X.T.; et al. Enhancing Wound Healing through Sonodynamic Silver/Barium Titanate Heterostructures-Loading Gelatin/PCL Nanodressings. *Int J Biol Macromol* 2024, 283, 137648, doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.137648.
126. Fei, Y.; Huang, Q.; Hu, Z.; Yang, X.; Yang, B.; Liu, S. Biomimetic Cerium Oxide Loaded Gelatin PCL Nanosystems for Wound Dressing on Cutaneous Care Management of Multidrug-Resistant Bacterial Wound Healing. *J Clust Sci* 2021, 32, 1289–1298, doi:10.1007/s10876-020-01866-9.
127. Shabanloo, R.; Montazer, M.; Farahani, A.; Karimi, N. A Review on Surface Modification of Nanofibrous Textiles for Diverse Applications: Focus on Medical Uses. *Heliyon* 2025, 11, 41863, doi:10.1016/j.heliyon.2025.e41863.
128. Behere, I.; Ingavle, G. In Vitro and in Vivo Advancement of Multifunctional Electrospun Nanofiber Scaffolds in Wound Healing Applications: Innovative Nanofiber Designs, Stem Cell Approaches, and Future Perspectives. *J Biomed Mater Res A* 2022, 110, 443–461.
129. Wieszczycka, K.; Staszak, K.; Woźniak-Budych, M.J.; Litowczenko, J.; Maciejewska, B.M.; Jurga, S. Surface Functionalization – The Way for Advanced Applications of Smart Materials. *Coord Chem Rev* 2021, 436, 213846, doi: 10.1016/j.ccr.2021.213846.
130. Afshari, E.; Mazinani, S.; Ranaei-Siadat, S.-O.; Ghomi, H. Surface Modification of Polyvinyl Alcohol/Malonic Acid Nanofibers by Gaseous Dielectric Barrier Discharge Plasma for Glucose Oxidase Immobilization. *Appl Surf Sci* 2016, 385, 349–355, doi: 10.1016/j.apsusc.2016.05.119.
131. Hegemann, D.; Brunner, H.; Oehr, C. Plasma Treatment of Polymers for Surface and Adhesion Improvement. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 2003, 208, 281–286, doi: 10.1016/S0168-583X(03)00644-X.
132. Höcker, H. Plasma Treatment of Textile Fibers; *Pure Appl. Chem.* 2002, 74, (3), 423–427, doi:10.1351/pac200274030423
133. Nabil, I.A.; Eid, B.M. Plasma Treatment Technology for Surface Modification and Functionalization of Cellulosic Fabrics. In *Advances in Functional Finishing of Textiles*; Shahid Mohammad and Adivarekar, R., Ed.; Springer Singapore: Singapore, 2020, 275–287 doi:10.1007/978-981-15-3669-4_12.
134. Vatanpour, V.; Castro-Muñoz, R.; Keskin, B.; Koyuncu, I. Plasma in Fabrication and Modification of Polymeric Membranes. *Desalination* 2025, 599, 11844, doi: 10.1016/j.desal.2024.118444

135. Weldemhret, T.G.; Park, Y.T.; Song, J.I. Recent progress in surface engineering methods and advanced applications of flexible polymeric foams. *Advances in Colloid and Interface Science* 2024, 325, 103312, doi: 10.1016/j.cis.2024.103132.
136. Levchenko, I.; Xu, S.; Baranov, O.; Bazaka, O.; Ivanova, E.P.; Bazaka, K. Plasma and Polymers: Recent Progress and Trends. *Molecules* 2021, 26, doi:10.3390/molecules26134091.
137. Dufour, T. From Basics to Frontiers: A Comprehensive Review of Plasma-Modified and Plasma-Synthesized Polymer Films. *Polymers (Basel)* 2023, 15(17), 3607, doi: 10.3390/polym15173607.
138. Okyere, A.Y.; Rajendran, S.; Annor, G.A. Cold Plasma Technologies: Their Effect on Starch Properties and Industrial Scale-up for Starch Modification. *Curr Res Food Sci* 2022, 5, 451–463, doi: 10.1016/j.crfs.2022.02.007.
139. Bormashenko, E.; Whyman, G.; Multanen, V.; Shulzinger, E.; Chaniel, G. Physical Mechanisms of Interaction of Cold Plasma with Polymer Surfaces. *J Colloid Interface Sci* 2015, 448, 175–179, doi:10.1016/j.jcis.2015.02.025.
140. Pitto, M.; Fiedler, H.; Kim, N.K.; Verbeek, C.J.R.; Allen, T.D.; Bickerton, S. Carbon fibre surface modification by plasma for enhanced polymeric composite performance: A review. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 2024, 180, 108087, doi:10.1016/j.compositesa.2024.108087
141. Vesel, A.; Mozetic, M.; Drenik, A.; Hauptman, N.; Balat-Pichelin, M. High Temperature Oxidation of Stainless Steel AISI316L in Air Plasma. *Appl Surf Sci* 2008, 255, 1759–1765, doi: 10.1016/j.apsusc.2008.06.017.
142. Kim, M.C.; Yang, S.H.; Boo, J.; Han, J.-S. Surface Treatment of Metals Using an Atmospheric Pressure Plasma Jet and Their Surface Characteristics. *Surf Coat Technol* 2003, 174, 839–844, doi:10.1016/S0257-8972(03)00560-7.
143. Bahrami, N.; Nouri Khorasani, S.; Mahdavi, H.; Ghiaci, M.; Mokhtari, R. Low-Pressure Plasma Surface Modification of Polyurethane Films with Chitosan and Collagen Biomolecules. *J Appl Polym Sci* 2019, 136, 47567, doi: 10.1002/app.47567.
144. Wolf, R.; Sparavigna, A.C. Role of Plasma Surface Treatments on Wetting and Adhesion. *Engineering* 2010, 02, 397–402, doi:10.4236/eng.2010.26052.
145. Feitor, M.C.; Junior, C.A.; Bezerra, C.M.; De Sousa, R.R.M.; De Carvalho Costa, T.H. Evaluation of Aging in Air of Poly (Ethylene Terephthalat) in Oxygen Plasma. *Materials Research* 2015, 18, 891–896, doi:10.1590/1516-1439.305814.
146. Liu, W.; Zhan, J.; Su, Y.; Wu, T.; Wu, C.; Ramakrishna, S.; Mo, X.; Al-Deyab, S.S.; El-Newehy, M. Effects of Plasma Treatment to Nanofibers on Initial Cell Adhesion and Cell Morphology. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014, 113, 101–106, doi:10.1016/j.colsurfb.2013.08.031.
147. Kim, D.; Choi, H.; Lee, M.J.; Cho, W.J.; Lee, G.W.; Seo, Y.K.; Arai, Y.; Lee, S.H. Oxygen Plasma-Modified Polycaprolactone Nanofiber Membrane Activates the Biological Function in Cell Adhesion, Proliferation, and Migration through the Phosphorylation of FAK and ERK1/2, Enhancing Bone Regeneration. *Chemical Engineering Journal* 2024, 499, 156003, doi:10.1016/j.cej.2024.156003.
148. Das, P.; Ojah, N.; Kandimalla, R.; Mohan, K.; Gogoi, D.; Dolui, S.K.; Choudhury, A.J. Surface Modification of Electrospun PVA/Chitosan Nanofibers by Dielectric Barrier Discharge

- Plasma at Atmospheric Pressure and Studies of Their Mechanical Properties and Biocompatibility. *Int J Biol Macromol* 2018, 114, 1026–1032, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.03.115.
149. Altgen, D.; Altgen, M.; Kyrrö, S.; Rautkari, L.; Mai, C. Time-Dependent Wettability Changes on Plasma-Treated Surfaces of Unmodified and Thermally Modified European Beech Wood. *European Journal of Wood and Wood Products* 2020, 78, 417–420, doi:10.1007/s00107-020-01505-0.
 150. Coad, B.R.; Favia, P.; Vasilev, K.; Griesser, H.J. Plasma Polymerization for Biomedical Applications: A Review. *Plasma Processes and Polymers* 2022, 19, 2200121, doi:10.1002/ppap.20220012.
 151. Yin, Y.; Bilek, M.M.M.; McKenzie, D.R.; Nosworthy, N.J.; Kondyurin, A.; Youssef, H.; Byrom, M.J.; Yang, W. Acetylene Plasma Polymerized Surfaces for Covalent Immobilization of Dense Bioactive Protein Monolayers. *Surf Coat Technol* 2009, 203, 1310–1316, doi:10.1016/j.surfcoat.2008.10.035.
 152. Bilek, M.M.; McKenzie, D.R. Plasma Modified Surfaces for Covalent Immobilization of Functional Biomolecules in the Absence of Chemical Linkers: Towards Better Biosensors and a New Generation of Medical Implants. *Biophys Rev* 2010, 2, 55–65, doi:10.1007/s12551-010-0028-1.
 153. Michlíček, M.; Blahová, L.; Dvořáková, E.; Nečas, D.; Zajíčková, L. Deposition Penetration Depth and Sticking Probability in Plasma Polymerization of Cyclopropylamine. *Appl Surf Sci* 2021, 540, 147979, doi:10.1016/j.apsusc.2020.147979.
 154. Babaei, S.; Girard-Lauriault, P.L. Tuning the Surface Properties of Oxygen-Rich and Nitrogen-Rich Plasma Polymers: Functional Groups and Surface Charge. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 2016, 36, 651–666, doi:10.1007/s11090-015-9682-1.
 155. Kupka, V.; Dvořáková, E.; Manakhov, A.; Michlíček, M.; Petruš, J.; Vojtová, L.; Zajíčková, L. Well-Blended PCL/PEO Electrospun Nanofibers with Functional Properties Enhanced by Plasma Processing. *Polymers (Basel)* 2020, 12(6), 1403, doi:10.3390/polym12061403.
 156. Morand, G.; Guyon, C.; Chevallier, P.; Saget, M.; Semetey, V.; Mantovani, D.; Tatoulian, M. Investigation of 3-Aminopropyltrimethoxysilane for Direct Deposition of Thin Films Containing Primary Amine Groups by Open-Air Plasma Jets. *Plasma Processes and Polymers* 2022, 19, 2200047, doi:10.1002/ppap.202200047.
 157. Asadian, M.; Chan, K.V.; Egghe, T.; Onyshchenko, Y.; Grande, S.; Declercq, H.; Cools, P.; Morent, R.; De Geyter, N. Acrylic Acid Plasma Polymerization and Post-Plasma Ethylene Diamine Grafting for Enhanced Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Behaviour on Polycaprolactone Nanofibers. *Appl Surf Sci* 2021, 563, 150363, doi:10.1016/j.apsusc.2021.150363.
 158. Huang, M.S.; Wu, C.Y.; Ou, K.L.; Huang, B.H.; Chang, T.H.; Endo, K.; Cho, Y.C.; Lin, H.Y.; Liu, C.M. Preparation of a Biofunctionalized Surface on Titanium for Biomedical Applications: Surface Properties, Wettability Variations, and Biocompatibility Characteristics. *Applied Sciences (Switzerland)* 2020, 10(4), 1438, doi:10.3390/app10041438.
 159. Finke, B.; Hempel, F.; Testrich, H.; Artemenko, A.; Rebl, H.; Kylián, O.; Meichsner, J.; Biederman, H.; Nebe, B.; Weltmann, K.-D.; et al. Plasma Processes for Cell-Adhesive Titanium Surfaces Based on Nitrogen-Containing Coatings. *Surf Coat Technol* 2011, 205, S520–S524, doi:10.1016/j.surfcoat.2010.12.044.

160. Puleo, D.A.; Kissling, R.A.; Sheu, M.-S. A Technique to Immobilize Bioactive Proteins, Including Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4), on Titanium Alloy. *Biomaterials* 2002, 23, 2079–2087, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00339-8.
161. Manakhov, A.; Kedroňová, E.; Medalová, J.; Černochová, P.; Obrusník, A.; Michlíček, M.; Shtansky, D. V.; Zajíčková, L. Carboxyl-Anhydride and Amine Plasma Coating of PCL Nanofibers to Improve Their Bioactivity. *Mater Des* 2017, 132, 257–265, doi: 10.1016/j.matdes.2017.06.057.
162. Asadian, M.; Chan, K.V.; Egghe, T.; Onyshchenko, Y.; Grande, S.; Declercq, H.; Cools, P.; Morent, R.; De Geyter, N. Acrylic Acid Plasma Polymerization and Post-Plasma Ethylene Diamine Grafting for Enhanced Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Behaviour on Polycaprolactone Nanofibers. *Appl Surf Sci* 2021, 563, 150363, doi: 10.1016/j.apsusc.2021.150363.
163. Permyakova, E.S.; Manakhov, A.M.; Kiryukhantsev-Korneev, P. V.; Sheveyko, A.N.; Gudz, K.Y.; Kovalskii, A.M.; Polčák, J.; Zhitnyak, I.Y.; Gloushankova, N.A.; Dyatlov, I.A.; et al. Different Concepts for Creating Antibacterial yet Biocompatible Surfaces: Adding Bactericidal Element, Grafting Therapeutic Agent through COOH Plasma Polymer and Their Combination. *Appl Surf Sci* 2021, 556, 149751, doi:10.1016/j.apsusc.2021.149751.
164. Griffin, M.F.; Ibrahim, A.; Seifalian, A.M.; Butler, P.E.M.; Kalaskar, D.M.; Ferretti, P. Chemical Group-Dependent Plasma Polymerisation Preferentially Directs Adipose Stem Cell Differentiation towards Osteogenic or Chondrogenic Lineages. *Acta Biomater* 2017, 50, 450–461, doi: 10.1016/j.actbio.2016.12.016.
165. Rinsch, C.L.; Chen, X.; Panchalingam, V.; Eberhart, R.C.; Wang, J.-H.; Timmons, R.B. Pulsed Radio Frequency Plasma Polymerization of Allyl Alcohol: Controlled Deposition of Surface Hydroxyl Groups. *Langmuir* 1996, 12, 2995–3002, doi:10.1021/la950685u.
166. Yang, Y.-W.; Camporeale, G.; Sardella, E.; Dilecce, G.; Wu, J.-S.; Palumbo, F.; Favia, P. Deposition of Hydroxyl Functionalized Films by Means of Water Aerosol-Assisted Atmospheric Pressure Plasma. *Plasma Processes and Polymers* 2014, 11, 1102–1111, doi: 10.1002/ppap.201400066.
167. Ameen, A.P.; Short, R.D.; Ward, R.J. The Formation of High Surface Concentrations of Hydroxyl Groups in the Plasma Polymerization of Allyl Alcohol. *Polymer (Guildf)* 1994, 35, 4382–4391, doi: 10.1016/0032-3861(94)90096-5.
168. Poncin-Epaillard, F.; Aouinti, M. Characterization of CO₂ Plasma and Interactions with Polypropylene Film. *Plasmas and Polymers* 2002, 7, 1–17, doi:10.1023/A:1015277316825.
169. Yoshida, Z.; Yosue, H.; Nogami, G. Conversion of CO₂ to CO and Hydrocarbons by Plasma Reaction. *J Electrochem Soc* 2001, 148(5), D55, doi:10.1149/1.1362544.
170. Legeay, G.; Arnaud, C.; Fabienne, P.-E.; Jean Marie, H.; and Bellon-Fontaine, M.N. Surface Engineering and Cell Adhesion. *J Adhes Sci Technol* 2010, 24, 2301–2322, doi:10.1163/016942410X508037.
171. Médard, N.; Aouinti, M.; Poncin-Epaillard, F.; Bertrand, P. ToF-SIMS Ability to Quantify Surface Chemical Groups: Correlation with XPS Analysis and Spectrochemical Titration. *Surface and Interface Analysis* 2001, 31, 1042–1047, doi: 10.1002/sia.1138.
172. Rezaei, F.; Shokri, B.; Sharifian, M. Atmospheric-Pressure DBD Plasma-Assisted Surface Modification of Polymethyl Methacrylate: A Study on Cell Growth/Proliferation and Antibacterial Properties. *Appl Surf Sci* 2016, 360, 641–651, doi: 10.1016/j.apsusc.2015.11.036.

173. Guex, A.G.; Hegemann, D.; Giraud, M.N.; Tevaearai, H.T.; Popa, A.M.; Rossi, R.M.; Fortunato, G. Covalent Immobilisation of VEGF on Plasma-Coated Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014, 123, 724–733, doi:10.1016/j.colsurfb.2014.10.016.
174. Vandenbossche, M.; Bernard, L.; Rupper, P.; Maniura-Weber, K.; Heuberger, M.; Faccio, G.; Hegemann, D. Micro-Patterned Plasma Polymer Films for Bio-Sensing. *Mater Des* 2017, 114, 123–128, doi:10.1016/j.matdes.2016.10.058.
175. Ruiz, J.-C.; Girard-Lauriault, P.-L.; Wertheimer, M.R. Fabrication, Characterization, and Comparison of Oxygen-Rich Organic Films Deposited by Plasma- and Vacuum-Ultraviolet (VUV) Photo-Polymerization. *Plasma Processes and Polymers* 2015, 12, 225–236, doi:10.1002/ppap.201400146
176. Wang, M.-J.; Chang, Y.-I.; Poncin-Epaillard, F. Acid and Basic Functionalities of Nitrogen and Carbon Dioxide Plasma-Treated Polystyrene. *Surface and Interface Analysis* 2005, 37, 348–355, doi:10.1002/sia.2029.
177. Médard, N.; Soutif, J.-C.; Poncin-Epaillard, F. CO₂, H₂O, and CO₂/H₂O Plasma Chemistry for Polyethylene Surface Modification. *Langmuir* 2002, 18, 2246–2253, doi:10.1021/la011481i.
178. Aouinti, M.; Bertrand, P.; Poncin, F. Characterization of Polypropylene Surface Treated in a CO₂ Plasma. *Plasmas Polym* 2003, 8, 225–236, doi:10.1023/A:1026392525543.
179. Médard, N.; Soutif, J.-C.; Poncin-Epaillard, F. Characterization of CO₂ Plasma-Treated Polyethylene Surface Bearing Carboxylic Groups. *Surf Coat Technol* 2002, 160, 197–205, doi:10.1016/S0257-8972(02)00407-3.
180. Körner, E.; Fortunato, G.; Hegemann, D. Influence of RF Plasma Reactor Setup on Carboxylated Hydrocarbon Coatings. *Plasma Processes and Polymers* 2009, 6, 119–125, doi:10.1002/ppap.200800102.
181. Hegemann, D.; Michlíček, M.; Blanchard, N.E.; Schütz, U.; Lohmann, D.; Vandenbossche, M.; Zajíčková, L.; Drábik, M. Deposition of Functional Plasma Polymers Influenced by Reactor Geometry in Capacitively Coupled Discharges. *Plasma Processes and Polymers* 2016, 13, 279–286, doi:10.1002/ppap.201500078.
182. Drábik, M.; Kousal, J.; Celma, C.; Rupper, P.; Biederman, H.; Hegemann, D. Influence of Deposition Conditions on Structure and Aging of C:H:O Plasma Polymer Films Prepared from Acetone/CO₂ Mixtures. *Plasma Processes and Polymers* 2014, 11, 496–508, doi:10.1002/ppap.201400005.
183. Hegemann, D.; Körner, E.; Guimond, S. Plasma Polymerization of Acrylic Acid Revisited. *Plasma Processes and Polymers* 2009, 6, 246–254, doi:10.1002/ppap.200800089.
184. Terlingen, J.G.A.; Gerritsen, H.F.C.; Hoffman, A.S.; Feijen, J. Introduction of Functional Groups on Polyethylene Surfaces by a Carbon Dioxide Plasma Treatment. *J Appl Polym Sci* 1995, 57, 969–982, doi:10.1002/app.1995.070570809.
185. Wang, M.-J.; Chang, Y.-I.; Poncin-Epaillard, F. Illustration of the Interface between N₂/CO₂ Plasmas and Polystyrene Surface. *Surface and Interface Analysis* 2005, 37, 325–331, doi:10.1002/sia.2024.
186. Sério, S. Advanced Nanostructured Coatings Deposited by Magnetron Sputtering: Innovations, Applications, and Future Prospects. *Coatings* 2024, 14(8), 1041, doi:10.3390/coatings14081041.

187. Depla, D.; Mahieu, S.; Greene, J.E. Chapter 5 - Sputter Deposition Processes. In *Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings* (Third Edition); Martin, P.M., Ed.; William Andrew Publishing: Boston, 2010, 253–296, doi: 10.1016/B978-0-8155-2031-3.00005-3
188. Kelly, P.J.; Arnell, R.D. Magnetron Sputtering: A Review of Recent Developments and Applications. *Vacuum* 2000, 56(3), 159–172, doi: 10.1016/S0042-207X(99)00189-X.
189. Sait, R.; Al-Jawhari, H.; Ganash, A.; Wustoni, S.; Chen, L.; Hedhili, M.N.; Wehbe, N.; Hussein, D.; Alhowity, A.; Baesa, S.; et al. Electrochemical Performance of Biocompatible TiC Films Deposited through Nonreactive RF Magnetron Sputtering for Neural Interfacing. *ACS Biomater Sci Eng* 2024, 10, 391–404, doi:10.1021/acsbiomaterials.3c01371.
190. Tang, J.; Zabinski, J.S.; Bultman, J.E. TiC Coatings Prepared by Pulsed Laser Deposition and Magnetron Sputtering. *Surf Coat Technol* 1997, 91, 69–73, doi:10.1016/S0257-8972(96)03124-6.
191. Ait Djafer, A.Z.; Saoula, N.; Madaoui, N.; Zerizer, A. Deposition and Characterization of Titanium Carbide Thin Films by Magnetron Sputtering Using Ti and TiC Targets. *Appl Surf Sci* 2014, 312, 57–62, doi:10.1016/j.apsusc.2014.05.084.
192. Lenis, J.A.; Romero, E.C.; Macías, A.H.; Rico, P.; Ribelles, J.L.G.; Pacha-Olivenza, M.A.; González-Martín, M.L.; Bolívar, F.J. Mechanical, Structural, and Biological Evaluation of Multilayer HA-Ag/TiO₂/TiN/Ti Coatings on Ti6Al4V Obtained by Magnetron Sputtering for Implant Applications. *Surf Coat Technol* 2022, 449, 128925, doi:10.1016/j.surfcoat.2022.128925.
193. Rodríguez Maya, S.; Restrepo Posada, M.; Lenis Rodas, J.A.; Bejarano Gaitan, G.; Bolívar Osorio, F.J. Microstructural and Tribological Properties of TiO₂/Ag Multilayer Coatings Using Magnetron Sputtering Technique for Potential Applications in Non-Permanent Implants. *Thin Solid Films* 2024, 789, 140168, doi:10.1016/j.tsf.2023.140168.
194. Del Re, M.; Gouttebaron, R.; Dauchot, J.-P.; Leclère, P.; Terwagne, G.; Hecq, M. Study of ZrN Layers Deposited by Reactive Magnetron Sputtering. *Surf Coat Technol* 2003, 174–175, 240–245, doi:10.1016/S0257-8972(03)00679-0.
195. Kuznetsova, T.; Lapitskaya, V.; Khabarava, A.; Chizhik, S.; Warcholinski, B.; Gilewicz, A. The Influence of Nitrogen on the Morphology of ZrN Coatings Deposited by Magnetron Sputtering. *Appl Surf Sci* 2020, 522, 146508, doi:10.1016/j.apsusc.2020.146508.
196. Sunke, V.; Naik Bukke, G.; Suda, U. Characterisation of Nanostructured ZrO₂ Thin Films Formed by DC Reactive Magnetron Sputtering. *Nanomed Res.* 2018, 7(2), 65–68, doi:10.15406/jnmr.2018.07.00177.
197. Zegtouf, H.; Saoula, N.; Azibi, M.; Sali, S.; Mechri, H.; Sam, S.; Khelladi, M.R.; Kechouane, M. Influence of Oxygen Percentage on in Vitro Bioactivity of Zirconia Thin Films Obtained by RF Magnetron Sputtering. *Appl Surf Sci* 2020, 532, 147403, doi: 10.1016/j.apsusc.2020.147403.
198. Goreninskii, S.I.; Bogomolova, N.N.; Malchikhina, A.I.; Golovkin, A.S.; Bolbasov, E.N.; Safronova, T. V.; Putlyaev, V.I.; Tverdokhlebov, S.I. Biological Effect of the Surface Modification of the Fibrous Poly(L-Lactic Acid) Scaffolds by Radio Frequency Magnetron Sputtering of Different Calcium-Phosphate Targets. *Bionanoscience* 2017, 7, 50–57, doi:10.1007/s12668-016-0383-x.
199. Badaraev, A.D.; Nemoykina, A.L.; Bolbasov, E.N.; Tverdokhlebov, S.I. PLLA Scaffold Modification Using Magnetron Sputtering of the Copper Target to Provide Antibacterial Properties. *Resource-Efficient Technologies* 2017, 3, 204–211, doi:10.1016/j.reffit.2017.05.004.

200. Kalakonda, P.; Aldhahri, M.A.; Abdel-Wahab, M.S.; Tamayol, A.; Moghaddam, K.M.; Ben Rached, F.; Pain, A.; Khademhosseini, A.; Memic, A.; Chaieb, S. Microfibrous Silver-Coated Polymeric Scaffolds with Tunable Mechanical Properties. *RSC Adv* 2017, 7, 34331–34338, doi:10.1039/c6ra25151j.
201. Valerini, D.; Tammaro, L.; Vitali, R.; Guillot, G.; Rinaldi, A. Sputter-Deposited Ag Nanoparticles on Electrospun PCL Scaffolds: Morphology, Wettability and Antibacterial Activity. *Coatings* 2021, 11(3), 345, doi:10.3390/coatings11030345.
202. Ponomarev, V.A.; Sheveyko, A.N.; Permyakova, E.S.; Lee, J.; Slukin, P. V; Voevodin, A.A.; Berman, D.; Manakhov, A.M.; Michl, M.; Firstova, V. V; et al. TiCaPCON-Supported Pt- and Fe-Based Nanoparticles and Related Antibacterial Activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019, 11(32), 28699–28719, doi:10.1021/acsami.9b09649.
203. Manakhov, A.; Permyakova, E.S.; Ershov, S.; Sheveyko, A.; Kovalskii, A.; Polčák, J.; Zhitnyak, I.Y.; Gloushankova, N.A.; Zajíčková, L.; Shtansky, D.V. Bioactive TiCaPCON-Coated PCL Nanofibers as a Promising Material for Bone Tissue Engineering. *Appl Surf Sci* 2019, 479, 796–802, doi:10.1016/j.apsusc.2019.02.163.
204. Ponomarev, V.A.; Sheveyko, A.N.; Sukhorukova, I. V.; Shvindina, N. V.; Manakhov, A.M.; Zhitnyak, I.Y.; Gloushankova, N.A.; Fursova, N.K.; Ignatov, S.G.; Permyakova, E.S.; et al. Microstructure, Chemical and Biological Performance of Boron-Modified TiCaPCON Films. *Appl Surf Sci* 2019, 465, 486–497, doi:10.1016/j.apsusc.2018.09.157.
205. Shtansky, D.; Petrzhik, M.; Bashkova, I.A.; Kiryukhantsev-Korneev, P.; Sheveyko, A.N.; Levashov, E. Adhesion, Friction and Deformation Characteristics of the Coatings Ti-(Ca, Zr)-(C, N, O, P) for Orthopedic and Teeth Implants. *Solid State Physics*. 2006, 46, 1231–1238, doi:10.1134/S1063783406070146.
206. Shtansky, D.; Grigoryan, A.; Toporkova, A.; Arkhipov, A.; Sheveyko, A.N.; Kiryukhantsev-Korneev, P. Modification of Polytetrafluoroethylene Implants by Depositing TiCaPCON Films with and without Stem Cells. *Surf. Coat. Tech.* 2011, 206, 1188–1195, doi:10.1016/j.surfcoat.2011.08.029.
207. Permyakova, E.S.; Manakhov, A.M.; Kiryukhantsev-Korneev, P. V; Leybo, D. V; Konopatsky, A.S.; Makarets, Y.A.; Filippovich, S.Y.; Ignatov, S.G.; Shtansky, D. V Electrospun Polycaprolactone/ZnO Nanocomposite Membranes with High Antipathogen Activity. *Polymers (Basel)* 2022, 14(24), 5364, doi:10.3390/polym14245364.
208. Manakhov, A.; Kiryukhantsev-Korneev, P.; Michlíček, M.; Permyakova, E.; Dvořáková, E.; Polčák, J.; Popov, Z.; Visotin, M.; Shtansky, D. V. Grafting of Carboxyl Groups Using CO₂/C₂H₄/Ar Pulsed Plasma: Theoretical Modeling and XPS Derivatization. *Appl Surf Sci* 2018, 435, 1220–1227, doi:10.1016/j.apsusc.2017.11.174.
209. Sukhorukova, I. V; Sheveyko, A.N.; Kiryukhantsev-Korneev, P. V; Levashov, E.A.; Shtansky, D. V In Vitro Bioactivity Study of TiCaPCO(N) and Ag-Doped TiCaPCO(N) Films in Simulated Body Fluid. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2017, 105, 193–203, doi:10.1002/jbm.b.33534.
210. Sheveyko, A.N.; Sukhorukova, I.V.; Kiryukhantsev-Korneev, P.V.; Shtansky, D.V. A Comparative Study of the Structure and Chemical Properties of Nanocomposite TiCaPCON-Ag Coatings. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces* 2015, 51, 416–426, doi:10.1134/S2070205115030235.

211. Sukhorukova, I. V; Sheveyko, A.N.; Manakhov, A.; Zhitnyak, I.Y.; Gloushankova, N.A.; Denisenko, E.A.; Filippovich, S.Y.; Ignatov, S.G.; Shtansky, D. V Synergistic and Long-Lasting Antibacterial Effect of Antibiotic- Loaded TiCaPCON-Ag Films against Pathogenic Bacteria and Fungi. *Materials Science & Engineering C* 2018, 1(90), 289–299, doi:10.1016/j.msec.2018.04.068.
212. Shtansky, D. V; Batenina, I. V; Yadroitsev, I.A.; Ryashin, N.S.; Kiryukhantsev-korneev, P. V Surface & Coatings Technology A New Combined Approach to Metal-Ceramic Implants with Controllable Surface Topography , Chemistry , Blind Porosity , and Wettability. *Surf Coat Technol* 2012, 208, 14–23, doi:10.1016/j.surfcoat.2012.07.008.
213. Sukhorukova, I. V; Sheveyko, A.N.; Kiryukhantsev-korneev, P. V; Anisimova, N.Y. Two Approaches to Form Antibacterial Surface : Doping with Bactericidal Element and Drug Loading. *Appl Surf Sci* 2015, 330, 339–350, doi:10.1016/j.apsusc.2014.12.119.
214. Chilkoti, A.; Ratner, B.D.; Briggs, D. Plasma-Deposited Polymeric Films Prepared from Carbonyl-Containing Volatile Precursors: XPS Chemical Derivatization and Static SIMS Surface Characterization. *Chemistry of Materials* 1991, 3, 51–61, doi:10.1021/cm00013a016.
215. Stoica, A.; Manakhov, A.; Polčák, J.; Ondračka, P.; Buršíková, V.; Zajíčková, R.; Zajíčková, L.; Stoica, A.; Manakhov, A. Cell Proliferation on Modified DLC Thin Films Prepared by Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition Cell Proliferation on Modified DLC Thin Films Prepared by Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition. *Biointerphases* 2015, 10, 29520, doi:10.1116/1.4920978.
216. Hantsche, H. (1993), High resolution XPS of organic polymers, the scienta ESCA300 database. By G. Beamson and D. Briggs, Wiley, Chichester 1992, doi:10.1002/adma.19930051035;
217. Franta, D. Variable-Angle Spectroscopic Ellipsometry of Considerably Non-Uniform Thin Films. *J. Opt.* 2011, 13, 85705, doi:10.1088/2040-8978/13/8/085705.
218. Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* 2006, 27, 2907–2915, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
219. Marques, M.R.C.; Loebenberg, R.; Almukainzi, M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolut Technol* 2011, 18(3), 15–28, doi: 10.14227/DT180311P15
220. Srinivasan, A.; Rajendran, N. Surface Characteristics, Corrosion Resistance and MG63 Osteoblast-like Cells Attachment Behaviour of Nano SiO₂-ZrO₂ Coated 316L Stainless Steel. *RSC Adv* 2015, 5, 26007–26016, doi:10.1039/c5ra01881a.
221. Permyakova, E.S.; Kiryukhantsev-Korneev, P. V.; Gudz, K.Y.; Konopatsky, A.S.; Polčák, J.; Zhitnyak, I.Y.; Gloushankova, N.A.; Shtansky, D. V.; Manakhov, A.M. Comparison of Different Approaches to Surface Functionalization of Biodegradable Polycaprolactone Scaffolds. *Nanomaterials* 2019, 9(12), 1769, doi:10.3390/nano9121769.
222. Ziegler, J.F., Biersack, J.P. (1985). The Stopping and Range of Ions in Matter. In: Bromley, D.A. (eds) *Treatise on Heavy-Ion Science*. Springer, Boston, MA, doi:10.1007/978-1-4615-8103-1_3.
223. Obisesan, O.S.; Ajiboye, T.O.; Mhlanga, S.D.; Mufhandu, H.T. Biomedical Applications of Biodegradable Polycaprolactone-Functionalized Magnetic Iron Oxides Nanoparticles and Their Polymer Nanocomposites. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2023, 227, 113342, doi: 10.1016/j.colsurfb.2023.113342.

224. Liverani, L.; Boccaccini, A.R. Versatile Production of Poly (Epsilon-Caprolactone) Fibers by Electrospinning Using Benign Solvents. *Nanomaterials* 2016, 6, 1–15, doi:10.3390/nano6040075.
225. Lee, K.H.; Kim, H.Y.; Bang, H.J.; Jung, Y.H.; Lee, S.G. The Change of Bead Morphology Formed on Electrospun Polystyrene Fibers. *Polymer (Guildf)* 2003, 44, 4029–4034, doi:10.1016/S0032-3861(03)00345-8.
226. Liverani, L.; Boccaccini, A.R. Versatile Production of Poly (Epsilon-Caprolactone) Fibers by Electrospinning Using Benign Solvents. *Nanomaterials* 2016, 6, 1–15, doi:10.3390/nano6040075.
227. Mishra, G.; McArthur, S.L. Plasma Polymerization of Maleic Anhydride: Just What Are the Right Deposition Conditions? *Langmuir* 2010, 26, 9645–9658, doi:10.1021/la100236c.
228. Chilkoti, A.; Ratner, B.D.; Briggs, D. Plasma-Deposited Polymeric Films Prepared from Carbonyl-Containing Volatile Precursors: XPS Chemical Derivatization and Static SIMS Surface Characterization. *Chemistry of Materials* 1991, 3, 51–61, doi:10.1021/cm00013a016.
229. Körner, E.; Fortunato, G.; Hegemann, D. Influence of RF Plasma Reactor Setup on Carboxylated Hydrocarbon Coatings. *Plasma Processes and Polymers* 2009, 6, 119–125, doi:10.1002/ppap.200800102.
230. Cools, P.; Declercq, H.; De Geyter, N.; Morent, R. A Stability Study of Plasma Polymerized Acrylic Acid Films. *Appl Surf Sci* 2017, 432, 214–223, doi:10.1016/j.apsusc.2017.04.015.
231. Fahmy, A.; Schönhals, A. Reaction of CO₂ Gas with (Radicals in) Plasma-Polymerized Acrylic Acid (and Formation of COOH-Rich Polymer Layers). *Plasma Processes and Polymers* 2016, 13, 499–508, doi:10.1002/ppap.201500128.
232. Manakhov, A.; Michlíček, M.; Nečas, D.; Josef, P.; Makhneva, E.; Eliáb, M.; Zajíčková, L. Carboxyl-Rich Coatings Deposited by Atmospheric Plasma Co-Polymerization of Maleic Anhydride and Acetylene. *Surf Coat Technol* 2015, 295, 37–45, doi:10.1016/j.surfcoat.2015.11.039.
233. Manakhov, A.; Michlíček, M.; Felten, A.; Pireaux, J.-J.; Nečas, D.; Zajíčková, L. XPS Depth Profiling of Derivatized Amine and Anhydride Plasma Polymers: Evidence of Limitations of the Derivatization Approach. *Appl Surf Sci* 2016, 394, 578–585, doi:10.1016/j.apsusc.2016.10.099.
234. Shtansky, D. V; Gloushankova, N.A.; Bashkova, I.A.; Kharitonova, M.A.; Moizhess, T.G.; Sheveiko, A.N.; Kiryukhantsev-Korneev, Ph.V.; Osaka, A.; Mavrin, B.N.; Levashov, E.A. Ta-Doped Multifunctional Bioactive Nanostructured Films. *Surf Coat Technol* 2008, 202, 3615–3624, doi:10.1016/j.surfcoat.2008.01.003.
235. Shtansky, D. V; Gloushankova, N.A.; Bashkova, I.A.; Kharitonova, M.A.; Moizhess, T.G.; Sheveiko, A.N.; Kiryukhantsev-Korneev, F. V; Petrzhik, M.I.; Levashov, E.A. Multifunctional Ti–(Ca,Zr)–(C,N,O,P) Films for Load-Bearing Implants. *Biomaterials* 2006, 27, 3519–3531, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.012.
236. Ponomarev VA, Sheveyko AN, Permyakova ES, Lee J, Voevodin AA, Berman D, Manakhov AM, Michlíček M, Slukin PV, Firstova VV, Ignatov SG, Chepkasov IV, Popov ZI, Shtansky DV. TiCaPCON-Supported Pt- and Fe-Based Nanoparticles and Related Antibacterial Activity. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019,11(32), 28699–28719, doi: 10.1021/acsami.9b09649.
237. Baker, S.R.; Banerjee, S.; Bonin, K.; Guthold, M. Determining the Mechanical Properties of Electrospun Poly-ε-Caprolactone (PCL) Nanofibers Using AFM and a Novel Fiber Anchoring

- Technique. *Materials Science and Engineering C* 2016, 59, 203–212, doi:10.1016/j.msec.2015.09.102.
238. Wang, W.; Wang, P.; Li, Q.; Dai, W.; Bingcheng, Y.; Gao, Z.; Liu, W.; Wang, X. Piezoelectrically-Enhanced Composite Membranes Mimicking the Tendinous Electrical Microenvironment for Advanced Tendon Repair. *Nano Today* 2024, 57, 102381, doi:10.1016/j.nantod.2024.102381.
239. Yaseri, R.; Fadaie, M.; Mirzaei, E.; Samadian, H.; Ebrahimezhad, A. Surface Modification of Polycaprolactone Nanofibers through Hydrolysis and Aminolysis: A Comparative Study on Structural Characteristics, Mechanical Properties, and Cellular Performance. *Sci Rep* 2023, 13, 9434, doi:10.1038/s41598-023-36563-w.
240. Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Solutions Able to Reproduce in Vivo Surface-structure Changes in Bioactive Glass-ceramic A-W3. *J Biomed Mater Res* 1990, 24, 721–734, doi:10.1002/jbm.820240607.
241. Roh, H.S.; Myung, S.W.; Jung, S.C.; Kim, B.H. Fabrication of 3D Scaffolds with Nano-Hydroxyapatite for Improving the Preosteoblast Cell-Biological Performance. *J Nanosci Nanotechnol* 2015, 15, 5585–5588, doi:10.1166/jnn.2015.10451.
242. D’Avila Carvalho Erbetta, C. Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Copolymer. *J Biomater Nanobiotechnol* 2012, 03, 208–225, doi:10.4236/jbnb.2012.32027.
243. Lin, H.Y.; Peng, Z.X. Nanofibers Grafted on Titanium Alloy: The Effects of Fiber Alignment and Density on Osteoblast Mineralization. *J Mater Sci Mater Med* 2017, 28, 140, doi:10.1007/s10856-017-5951-2.
244. Permyakova, E.S.; Polčák, J.; Slukin, P.V.; Ignatov, S.G.; Gloushankova, N.A.; Zajíčková, L.; Shtansky, D.V.; Manakhov, A. Antibacterial biocompatible PCL nanofibers modified by COOH-anhydride plasma polymers and gentamicin, *Materials and Design*, 2018, 153, pp. 60-70, DOI: 10.1016/j.matdes.2018.05.002
245. Zreiqat, H.; Standard, O.G.; Gengenbach, T.; Steele, J.G.; Howlett, C.R. The Role of Surface Characteristics in the Initial Adhesion of Human Bone-Derived Cells on Ceramics. *Cells and Materials* 1996, 6(1), 45–56, <https://digitalcommons.usu.edu/cellsandmaterials/vol6/iss1/5>

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Акт испытаний биоактивности образцов ПКЛ, ПКЛ-СООН, ПКЛ-TiCaPCON *in vitro*

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России)

115478, Москва, Каширское шоссе, д.24
Тел. +7(499)324-11-24, факс +7(499)323-57-77
ОГРН 1037739447525 ИНН/КПП 7724075162/772401001

АКТ ИСПЫТАНИЙ

г. Москва

«__» _____ 2020 г.

Проведены испытания биосовместимости и биоактивности *in vitro* поликапролактоновых, нановолокон, покрытых многокомпонентными наноструктурными покрытиями PCL-TiCaPCON, нановолокон с плазменно-осажденным полимером PCL-СООН, полученными в Национальном исследовательском технологическом университете МИСиС. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России было передано 3 группы образцов по 15 образцов в каждой группе.

Группа 1 немодифицированные поликапролактоновые нановолокна – образец сравнения.

Группа 2 поликапролактоновые нановолокна, покрытые многокомпонентным наноструктурированным покрытием PCL-TiCaPCON.

Группа 3 плазменно-модифицированные поликапролактоновые нановолокна.

Исследование организации актинового цитоскелета и фокальных контактов клеток с использованием флуоресцентно меченого фаллоидина и высокоспецифических антител к паксиллину позволяет оценить адгезивность тестируемых материалов. В качестве модельных систем использовали две линии клеток: остеобластные клетки MC3T3-E1 (ATCC, США) и эпителиальные клетки IAR-2. Клетки рассевали на поверхность образцов размером 15х15 мм, помещенных в 12-луночные планшеты с культуральной средой α -MEM (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (РАА, Австрия). Культуры росли в CO₂-инкубаторе при 37°C. Через 24 часа после посева клеток

на тестируемые подложки образцы фиксировали 3,7% параформальдегидом, мембрану фиксированных клеток экстрагировали 0,5% Тритоном-X100 в течение 3 мин.

Препараты инкубировали с первичными мышинными моноклональными антителами к белку фокальных адгезий паксиллину (BD Transduction Laboratories, США) и с вторичными козлиными антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с флуоресцентным красителем TRITC (Sigma, США) и фаллоидином, флуоресцентно-меченным Alexa488 (Molecular Probes, США), специфически связывающим филаментный актин. Далее препараты отмывали три раза фосфатным буферным раствором и заключали в фиксирующей среде, поместив на предметные стекла.

Морфологию клеток исследовали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа – Nikon Eclipse Ti с объективом x40 и цифровой камеры высокого разрешения ORCA-ER с программным обеспечением NIS-ElementsAR. Морфометрический анализ площади распластывания клеток на поверхности подложки выполняли с помощью программы ImageJ (NIH, США) для 30 контуров клеток, растущих на каждом типе образцов. Определяли среднюю площадь распластывания клеток, растущих на контрольных адгезивных стеклах и тестируемых образцах.

Жизнеспособность клеток, растущих на тестируемых подложках, определяли с помощью теста на пролиферацию. Клетки рассеивали в культуральной среде на изучаемые подложки и через 1, 3, 5, 7 дней после посева клетки фиксировали 3,7% формальдегидом. В качестве контрольной подложки использовали адгезивные покровные стекла. Мембрану клеток экстрагировали 0,5% тритоном X-100 (3 мин), после чего ядра клеток окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (Sigma, США). Пластины монтировали на предметных стеклах и с помощью микроскопа Аксиоплан (Zeiss, Германия) с объективом x20 и камеры высокого разрешения C8484-05 (Hamamatsu, Япония) подсчитывали количество клеток в 30 полях зрения в контроле и для каждого экспериментального образца. Далее определяли среднее значение клеточной популяции для каждой точки. Этот показатель позволяет оценить динамику пролиферации клеток на покрытиях.

Исследование биоактивности было осуществлено с использованием раннего маркера остеогенной дифференцировки – активности щелочной фосфатазы. Для этого клетки остеобластов MC3T3-E1 рассеивали на тестируемые образцы, помещенные в 12-луночные планшеты с культуральной средой α -MEM (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (РАА, Австрия), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 10 мМ β -глицерофосфата (Sigma, США). Культуры росли в термостате 14 дней при 37°C, через каждые три дня среду заменяли на свежую.

Остеобласты, растущие в течение 14 дней на тестируемых подложках и на контрольных стеклах, открепляли от поверхности подложки с помощью 0,1% трипсина/ЭДТА, промывали фосфатным буфером. После центрифугирования при 6000 об/мин в течение 6 мин в настольной центрифуге Эппендорф осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл 0,1% раствора тритона X100 в 10 мМ буфере Трис-НСl с 5 мМ $MgCl_2$. Далее осадок клеток лизировали в 3-х циклах последовательного замораживания-оттаивания (в морозильнике $-30^{\circ}C$, в воде при комнатной температуре). После центрифугирования клеток при 13000 об/мин в течение 20 мин в центрифуге Эппендорф, отбирали 150 мкл аликвоты супернатантов. Содержание белка в аликвотах определяли по методу Брэдфорда с использованием кита BioRad Laboratories (США) с помощью спектрофотометра Stat Fax 3200 (Awareness Technology Inc., США) при 630 нм.

В качестве субстрата колориметрической реакции использовали *p*-нитрофенилфосфат (BioRad Laboratories, США). В 96-луночных планшетах к 20 мкл супернатанта (в трех повторах) добавляли 100 мкл *p*-нитрофенилфосфата, реакционную смесь инкубировали при $37^{\circ}C$ в течение 60 мин. При ферментативном расщеплении бесцветного *p*-нитрофенилфосфата щелочной фосфатазой остеобластов образуется *p*-нитрофенол, имеющий желтое окрашивание. Продукт реакции определялся в области поглощения 405 нм с помощью спектрофотометра Stat Fax 3200. Активность щелочной фосфатазы оценивалась по концентрации *p*-нитрофенола, освобождающегося в результате реакции в единицу времени на миллиграмм клеточного белка (нМ *p*-нитрофенола /мин/мг белка). Данные для каждого типа образцов выражались как среднее значение $\pm$ ошибка среднего значения.

Результаты представлены в Таблицах 1-3

Таблица 1. Площадь распластывания клеток на разных типах подложек

Линия клеток	Стекло	Группа 1	Группа 2	Группа 3
IAR2	203 $\pm$ 14	192 $\pm$ 21	223 $\pm$ 19	235 $\pm$ 18
МС3Т3	1649 $\pm$ 218	576 $\pm$ 87	942 $\pm$ 118	1247 $\pm$ 188

Таблица 2. Пролиферация клеток на тестируемых образцах

Образцы	1 день	3 дня	5 дней	7 дней
IAR2				
Стекло	138 $\pm$ 15	629 $\pm$ 27	771 $\pm$ 46	781 $\pm$ 59
Группа 1	42 $\pm$ 9	566 $\pm$ 28	777 $\pm$ 40	743 $\pm$ 43
Группа 2	135 $\pm$ 26	569 $\pm$ 59	778 $\pm$ 25	624 $\pm$ 56

Группа 3	138,5±23	576±77	809±40	728±19
МСЗТЗ				
Стекло	18±3	26±5	34±3	25±3
Группа 1	40±4	23± 4	29±3	26±3
Группа 2	93±8	27±4	50±8	19±2
Группа 3	133±12	55±11	112±8	19±3

Таблица 3. Активность щелочной фосфатазы

Группа 1	532 ± 42
Группа 2	1005 ± 34
Группа 3	1714 ± 92

Полученные результаты свидетельствуют о том, что образцы 1 группы проявляют цитотоксический эффект. Образцы групп 2,3 являются биосовместимыми и проявляют биоактивность.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по научной работе

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»,

Директор НИИ канцерогенеза,



М.А. Красильников

2020г.

Зав. лаборатории механизмов канцерогенеза

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

д.б.н.

 Н.А. Глушанкова

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Акт испытаний биосовместимости образцов ПКЛ, ПКЛ-ГМион, ПКЛ-ГМков *in vitro*

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

(ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России)

115478, Москва, Каширское шоссе, д.24

Тел. +7(499)324-11-24, факс +7(499)323-57-77

ОГРН 1037739447525 ИНН/КПП 7724075162/772401001

АКТ ИСПЫТАНИЙ

г.Москва

« » 2020 г.

Проведены испытания биосовместимости *in vitro* поликапролактоновых нановолокон, нановолокон с плазменно-осажденным полимером PCL-COOH, а также с иммобилизованным ковалентно и электростатически антибиотиком гентамицином PCL-GMc и PCL-GMi, соответственно, полученными в Национальном исследовательском технологическом университете МИСиС. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России было передано 4 группы образцов по 15 образцов в каждой группе.

Группа 1 немодифицированные поликапролактоновые нановолокна – образец сравнения.

Группа 2 плазменно-модифицированные поликапролактоновые нановолокна.

Группа 3 поликапролактоновые нановолокна с электростатически иммобилизованным антибиотиком гентамицином.

Группа 4 поликапролактоновые нановолокна с ковалентно иммобилизованным антибиотиком гентамицином.

Исследование организации актинового цитоскелета и фокальных контактов клеток с использованием флуоресцентно меченого фаллоидина и высокоспецифических антител к паксиллину позволяет оценить адгезивность тестируемых материалов. В качестве модельной системы использовали линию эпителиальных клеток IAR-2. Клетки рассевали на поверхность размером образцов 15x15 мм, помещенных в 12-луночные планшеты с культуральной средой α -MEM (Invitrogen, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (РАА, Австрия). Культуры росли в термостате при 37°C. Через 24 часа после посева клеток на тестируемые подложки образцы фиксировали 3,7%

Таблица 2 – Пролиферация клеток на тестируемых образцах

Образцы	1 день	3 дня	5 дней	7 дней
Стекло	16,7±1,6	63,7±2,6	110,4±4,1	115,95±5,4
Группа 1	15,2±2,8	65,7±4,8	132,3±6,8	133,6±5,8
Группа 2	6,4±0,9	35,7±3,9	94,2±6,1	121,4±5,8
Группа 3	11,6±2,6	41,7±2,3	62,5±6,0	112,1±3,0
Группа 4	6,8±1,4	28,7 ± 3,3	87,1±4,3	78,4±5,2

Была показана высокая адгезия клеток линии IAR-2 к образцам групп 2-4, образцы группы 1 демонстрировали наименьшее количество прикрепившихся клеток. Пролиферативный тест на 7 день не выявил статистически значимых различий между контролем и образцами групп 2 и 3, а образцы группы 4 показали небольшую цитотоксичность. Пролиферация клеток на образцах группы 1 была выше, чем в контроле.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по научной работе

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»,

Директор НИИ канцерогенеза,

Проф.

М.А. Красильников

2020г.



Зав. лаборатории механизмов канцерогенеза

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Д.б.н.

Н.А. Глушанкова

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Акт испытаний антибактериальной активности образцов ПКЛ, ПКЛ-ГМион, ПКЛ-ГМков

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН ГНЦ ПМБ



И.А.Дятлов

2020 г.

АКТ ИСПЫТАНИЙ ГЕНТАМИЦИН-МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОВОЛОКОН

Проведены испытания бактериостатического эффекта для нановолокон с иммобилизованным на поверхности антибиотиком гентамицином, полученными в Национальном исследовательском технологическом университете «МИСиС». В ФБУН ГНЦ ПМБ было передано 4 группы образцов, по 10 образцов в каждой группе. Размер образца составлял 2,5 на 2,5 см.

Группа 1 – Немодифицированные поликапролактоновые нановолокна (PCL-ref) – образец сравнения

Группа 2 – Карбокси-модифицированные поликапролактоновые нановолокна (PCL-COOH) – образец сравнения.

Группа 3 – Поликапролактоновые нановолокна с ковалентно иммобилизованным антибиотиком гентамицином (PCL-GMc).

Группа 4 – Поликапролактоновые нановолокна с электростатически иммобилизованным антибиотиком гентамицином (PCL-GMi).

Больничные бактериальные штаммы с разной устойчивостью к гентамицину такие как *E.coli* K-19 (минимальная ингибирующая концентрация (МИК) 0.12 мг / мл - низкоустойчивый штамм), *E.coli* K-261 (МИК 128 мг / мл - устойчивый штамм), и *E.coli* K-41 (МИК 256 мг / мл - высокоустойчивый штамм) использовали для анализа антибактериальной активности модифицированных нановолокон PCL. 0,1 мл свежей суспензии тестируемых микроорганизмов (0,5 McFarland стандарт, 10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ)) в стерильном физиологическом растворе (NaCl, 9 г / л) помещали на поверхность агара Мюллера-Хинтона (HiMedia) в чашке Петри. Затем образцы модифицированной стороной вверх помещали на поверхность агара.

Чашки инкубировали при 37 ° С в течение 24 часов. Степень антибактериальной активности оценивали по диаметру зоны бактериального ингибирования вокруг образца. Эксперименты проводились в трех

экземплярах, статистические расчеты проводились с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

Результаты испытаний приведены в Таблице 1

Таблица 1 Зоны лизиса для тестируемых образцов после инкубации с различными штаммами *E.coli*

Образец	Диаметр зоны ингибирования, мм		
	Без предварительной выдержки в физ. растворе		
	<i>E.coli</i> K-19	<i>E.coli</i> K-261	<i>E.coli</i> K-41
Группа 1	0	0	0
Группа 2	0	0	0
Группа 3	28	21	17
Группа 4	25	19	16
	После выдержки в физ. растворе в течение 24 ч		
Группа 1	0	0	0
Группа 2	0	0	0
Группа 3	15	0	0
Группа 4	0	0	0

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все гентамицин-модифицированные образцы проявляют значительную антибактериальную активность. Причем ковалентная иммобилизация гентамицина приводит к сохранению бактерицидных свойств до двух дней.

Руководитель НИР

ГНС, Зав. лаб. Нанобиотехнологии

ФБУН ГНЦ ПМБ

Д.б.н.



С.Г. Игнатов

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Акт испытаний антибактериальной активности образцов ПКЛ, ПКЛ-TiCaPCON-Ag

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН ГНЦ ПМБ

И.А.Дятлов

2020 г.



АКТ ИСПЫТАНИЙ НАНОВОЛОКОН С ПОКРЫТИЕМ TiCaPCON-Ag

Проведены испытания бактериостатического эффекта для нановолокон с многокомпонентными наноструктурными покрытиями TiCaPCON-Ag, полученными в Национальном исследовательском технологическом университете «МИСиС». В ФБУН ГНЦ ПМБ было передано 4 группы образцов, по 10 образцов в каждой группе. Размер образца составлял 2,5 на 2,5 см.

Группа 1 – Немодифицированные поликапролактоновые нановолокна (PCL-gef) – образец сравнения

Группа 2 – Поликапролактоновые нановолокна, покрытые TiCaPCON-Ag -режим 1.

Группа 3 – Поликапролактоновые нановолокна, покрытые TiCaPCON-Ag -режим 2.

Группа 4 – Поликапролактоновые нановолокна, покрытые TiCaPCON-Ag -режим 3.

Противомикробная активность образцов была проверена на различных бактериальных штаммах (*E.coli* U 20, *S. aureus* 839, *B. subtilis* (Bacillus F) и типах грибов (*N.crassa* wt-987/nit2/nit6). 0,1 мл свежих суспензий тестируемых микроорганизмов (0,5 McFarland стандарт, 10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ)) в стерильном физиологическом растворе (NaCl, 9 г / л) помещали на поверхность агара Мюллера-Хинтона (HiMedia) в чашке Петри. Затем образцы модифицированной стороной вверх помещали на поверхность агара.

Чашки Петри находились при 37° С в течение 24 часов до подсчета КОЕ. Степень антибактериальной активности оценивали по уменьшению образования КОЕ.

Результаты испытаний приведены в Таблице 1

Таблица 1 – Антибактериальный эффект после инкубации с тестируемыми образцами

Тип штамма	Антибактериальный эффект			
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
<i>N.crassa</i> wt987	-	+	-	-
<i>N.crassa</i> nit 6	-	+	-	-
<i>N.crassa</i> nit 2	-	+	-	-
<i>E.coli</i> U20	-	+	-	-
<i>S.areus</i> 839	-	+	-	-
<i>Bacillus</i> F (Штамм, полученный из мерзлотных пород)	-	+	-	-

Отсутствие зон лизиса бактерий и грибов свидетельствует о том, что ионы серебра практически не высвобождаются из образцов, обеспечивая исключительно локальный антибактериальный эффект. Образцы группы 2 показали значительный антибактериальный эффект против всех исследуемых штаммов, в то время как образцы групп 3 и 4 практически не отличимы от контроля.

Руководитель НИР
ГНС, Зав. лаб. Нанобиотехнологии
ФБУН ГНЦ ПМБ
Д.б.н.

 С.Г. Игнатов

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Акт испытаний антибактериальной активности ПКЛ, ПКЛ-ZnO



МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ГЕОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ

119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, оф. 523
Телефон: (495) 939-13-01, Факс: (495) 932-88-89

04.04.2025 № 115-25/107-03

На № _____

МИНОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ



МИСИС
УНИВЕРСИТЕТ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «МИСИС»
(НИТУ МИСИС)

Ленинский проспект, 4, стр. 1, Москва, 119049
Тел. (495) 955-00-32; Факс: (499) 236-21-05

<http://www.misis.ru>

E-mail: kancela@misis.ru

ОКПО 02066500 ОГРН 1027739439749

АКТ ИСПЫТАНИЙ НАНОКОМПОЗИТНЫХ ВОЛОКОН ПКЛ-ZnO

Проведены испытания бактериостатического эффекта ультратонких волокон на основе полимера поликапролактона с наночастицами оксида цинка (ZnO). В качестве контроля использовали плазменно-обработанные поликапролактоновые волокна без наночастиц. Образцы были получены в Национальном исследовательском технологическом университете МИСИС. В МГУ и ФБУН ГНЦ ПМБ на испытания было передано 2 группы образцов по 20 шт. (размер 1×1 см) в каждой группе:

Группа 1: Контрольный образец плазменно-обработанных волокон из поликапролактона без наночастиц оксида цинка (ПКЛ-COOH).

Группа 2: Наноккомпозитные волокна ПКЛ-ZnO, полученные за счет выдержки плазменно-обработанных волокон в суспензии ZnO.

Образцы предварительно стерилизовали УФ-излучением с экспозицией 60 мин на расстоянии 15 см от излучателя. Культивирование микроорганизмов проводили в стерильном культуральном 12-луночном планшете «Corning® Costar®». Антипатогенная активность изучалась против двух видов госпитальных бактериальных штаммов, *Staphylococcus aureus* CSA154 и *Escherichia coli* U20 (*S. aureus* CSA154, *E. coli* U20), а также 2 видов грибов (*Neurospora crassa*, *Candida parapsilosis* ATCC90018). Для изучения антипатогенной активности планктонных форм образцы погружали в растворы патогенов (нормальный физиологический раствор (НС, NaCl = 9 г/л водный), содержащий 107 КОЕ/мл (для бактериальных культур) и 104 КОЕ/мл (для грибковых культур). Через 24 ч инкубации определяли количество живых планктонных патогенов путем десятичного титрования на чашках Петри с плотной питательной средой для подсчета количества КОЕ. Чем меньше КОЕ, тем выше антипатогенная активность образца.

Результаты испытаний приведены на Рисунке 1.

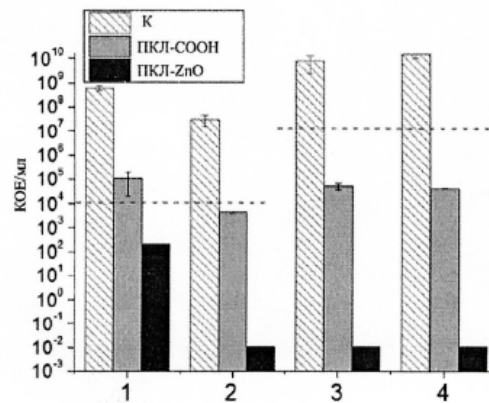


Рисунок 1 – противогрибковая и антибактериальная активность ПКЛ-СООН и ПКЛ-ЗnО в отношении *Candida parapsilosis* ATCC90018 (1), *Neurospora crassa* (2), *Escherichia coli* U20 (3) и *Staphylococcus aureus* CSA154 (4) оценивали по количеству КОЕ через 24 ч. К-контроль без образца. Пунктирные горизонтальные линии показывают начальную концентрацию клеток.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что:

1. Группа 2 полностью ингибировала штаммы *Escherichia coli* U20, *Staphylococcus aureus* CSA154, *Neurospora crassa* через 24 ч совместного инкубирования.
2. Группа 2 снизила концентрацию штамма *Candida parapsilosis* ATCC90018 на 7 порядков относительно контрольного роста (без образца) через 24 ч совместного инкубирования в физиологическом растворе.
3. Группа 1 замедляла рост патогенных микроорганизмов относительно контрольного роста.

доктор биологических наук,

Заведующий лабораторией планетарной и исторической

геокриологии, ФГБОУ ВО «Московский государственный

университет имени М.В.Ломоносова»,

геологический факультет, кафедра геокриологии

С.Г. Игнатов

Подпись сотрудника ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» С. Г. Игнатов удостоверяю:

Декан геологического факультета

Н.Н. Еремин



ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Акт испытаний антибактериальной активности образцов ПКЛ, ПКЛ-Ag



МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ГЕОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ

119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, оф. 523
Телефон: (495) 939-13-01, Факс: (495) 932-88-89

04.04.2015 № 116-25/107-03

На № _____

МИНОБРНАУКИ РОССИИ



МИСИС
УНИВЕРСИТЕТ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «МИСИС»
(ННТУ МИСИС)

Ленинский проспект, 4, стр. 1, Москва, 119049
Тел. (495) 955-00-32; Факс: (499) 236-21-05

<http://www.misis.ru>

E-mail: kancela@misis.ru

ОКПО 02066500 ОГРН 1027739439749

АКТ ИСПЫТАНИЙ НАНОКОМПОЗИТНЫХ ВОЛОКОН ПКЛ-Ag

Проведены испытания бактериостатического эффекта ультратонких волокон на основе полимера поликапролактона с наночастицами серебра. В качестве контроля использовали поликапролактоновые волокна без наночастиц. Образцы были получены в Национальном исследовательском технологическом университете «МИСиС». В МГУ и ФБУН ГНЦ ПМБ на испытания было передано 2 группы образцов по 24 шт. (размер 1×1 см) в каждой группе:

Группа 1: Контрольный образец волокон из поликапролактона без наночастиц серебра (ПКЛ).

Группа 2: Наноккомпозитные волокна ПКЛ-Ag, полученные за счет формирования наночастиц на поверхности плазменно-обработанных волокон при выдержке материала в нитрате серебра с последующим восстановлением под действием УФ-излучения.

Образцы предварительно стерилизовали УФ-излучением с экспозицией 60 мин на расстоянии 15 см от излучателя. Культивирование микроорганизмов проводили в стерильном культуральном 12-луночном планшете «Corning® Costar®». Антипатогенная активность изучалась против двух видов госпитальных бактериальных штаммов, *Staphylococcus aureus* CSA154 и *Escherichia coli* U20 (*S. aureus* CSA154, *E. coli* U20), а также 3 видов грибов (*Candida albicans* ATCC90028, *Candida parapsilosis* ATCC90018 и *Candida auris* CBS10913). Для изучения антипатогенной активности планктонных форм образцы погружали в растворы патогенов (нормальный физиологический раствор (НС, NaCl = 9 г/л водный), содержащий 107 КОЕ/мл (для бактериальных культур) и 104 КОЕ/мл (для грибковых культур). Через 6 и 24 ч инкубации определяли количество живых планктонных патогенов путем десятичного титрования на чашках Петри с плотной питательной средой для подсчета количества КОЕ. Предотвращение образования биопленок определяли после инкубации образцов с бактериальными/грибковыми клетками при температуре 37 °С в течение 24 ч. Образцы извлекали из лунки планшета, осторожно промывали три раза для удаления планктонных бактерий, а затем подвергали

сонированию на гомогенизаторе Зонпирер 150 (MSE Ltd., Сингапур). Обработку проводили в 5 мл 0,9% NaCl. Чем меньше КОЕ, тем выше антибиопленочная активность образца.

Результаты испытаний приведены на Рисунках 1 и 2.

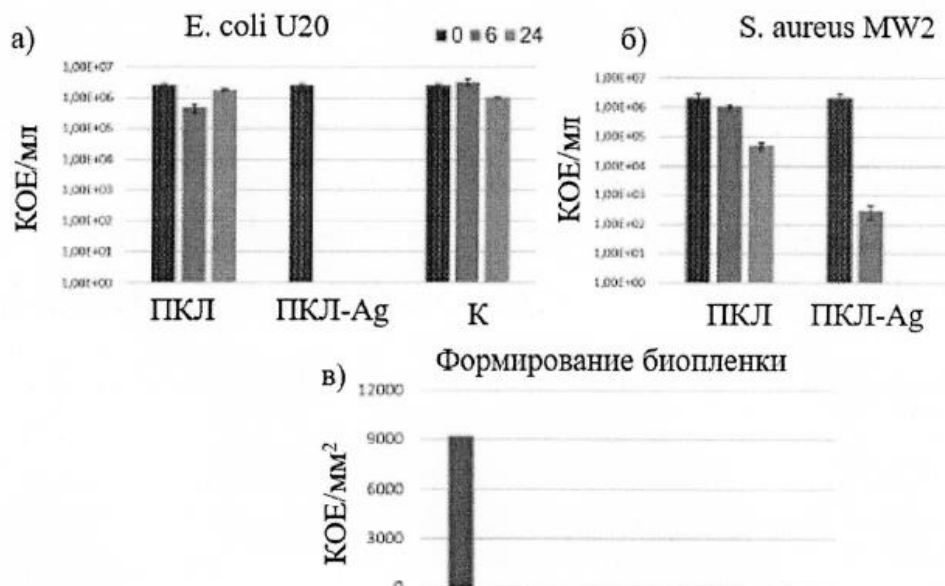


Рисунок 1 – Концентрация КОЕ после инкубации с госпитальными штаммами *E. coli* U20 (а), *S. aureus* MW2 (б) немодифицированных (ПКЛ) и модифицированных (ПКЛ-Ag) образцов и контрольным ростом без образца (К). Плотность КОЕ в биопленках, сформированных бактериальными штаммами на поверхности обработанных и необработанных образцов (г).

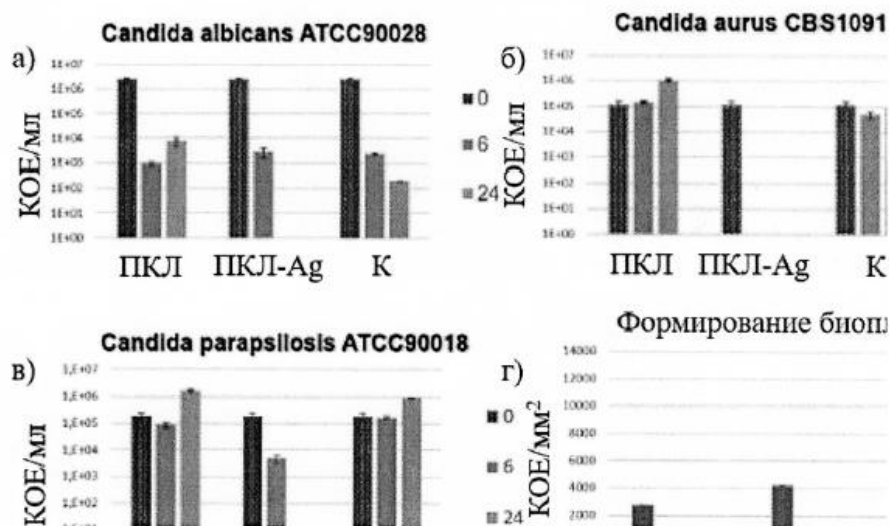


Рисунок 2 – Концентрация КОЕ после инкубации с грибковыми штаммами *Candida albicans* ATCC90028 (а), *Candida aurus* CBS10913 (б), *Candida parapsilosis* (в) немодифицированных (ПКЛ) и модифицированных (ПКЛ-Ag) образцов и контрольным ростом без образца (К). Плотность КОЕ в биопленках, сформированных грибными штаммами на поверхности обработанных и необработанных образцов (г).

полученные результаты свидетельствуют о том, что.

1. Группа 2 полностью ингибировала госпитальный штамм E.coli U20 через 6 ч совместного инкубирования и госпитальный штамм S.aureus MW2 через 24 ч.
2. Группа 2 полностью подавила все тестируемые грибковые штаммы через 24 ч совместного инкубирования в физиологическом растворе.
3. Группа 2 предотвращает формирование биопленки штаммов E.coli U20, Candida albicans ATCC90028, Candida auris CBS10913, Candida parapsilosis.

доктор биологических наук,

заведующий лабораторией планетарной и исторической геокриологии,

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени

М.В.Ломоносова», геологический факультет, кафедра геокриологии

 С.Г. Игнатов

Подпись сотрудника ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» С. Г. Игнатов удостоверяю:

Декан геологического факультета



 Н.Н. Еремин

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

Свидетельство о регистрации ноу-хау



СВИДЕТЕЛЬСТВО О РЕГИСТРАЦИИ НОУ-ХАУ

На основании «Положения о правовой охране секретов производства (ноу-хау) НИТУ «МИСиС», утвержденного ректором «15» декабря 2015 г., проведена регистрация секрета производства (ноу-хау):

Плазменная обработка термочувствительных нановолокнистых скаффолдов

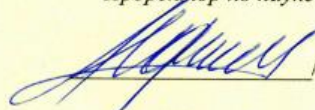
Правообладатель: *федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»*

Авторы: **Пермякова Елизавета Сергеевна,
Кирюханцев-Корнеев Филипп Владимирович,
Манахов Антон Михайлович,
Ковальский Андрей Михайлович,
Штанский Дмитрий Владимирович**

Зарегистрировано в Депозитарии ноу-хау НИТУ «МИСиС»
№ 02-457-2020 ОИС от “ 20” апреля 2020 г



Проректор по науке и инновациям

 /М.Р. Филонов/