

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ПЕТЕРБУРГСКИЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ ИМ. Б.П.
КОНСТАНТИНОВА НАЦИОНАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

На правах рукописи

КОЛБЕ

Константин Андреевич

**МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРЫ, ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ И МЕХАНИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ
БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ**

Специальность 1.4.7. Высокомолекулярные соединения

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук, доцент

Юдин Владимир Евгеньевич

Гатчина

2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Современное состояние проблемы регенерации кожи	14
1.1.1 Фазы заживления кожи.....	15
1.1.2 Биоэлектрические сигналы кожи и экзогенная электростимуляция	17
1.1.3 Требования к материалам для электростимуляции клеток кожи.....	21
1.2 Полимерные материалы как основа биоэлектронных и тканеинженерных систем	26
1.2.1 Природные полимеры для регенеративных материалов.....	28
1.2.2 Синтетические полимеры для биомедицинских применений.....	31
1.3 Электропроводящие наполнители в полимерных композиционных материалах	35
1.3.1 Классы проводящих компонентов.....	36
1.3.2 Перколяция и механизмы переноса заряда в полимерных композитах .	39
1.4 Формы и принципы разработки электропроводящих биоматериалов	42
1.4.1 Основные формы электропроводящих материалов.....	42
1.4.2 Рациональный дизайн электропроводящих биоматериалов.....	43
1.5 Методы электрической стимуляции.....	47
1.6 Перспективные подходы к электростимуляции заживления кожи.....	50
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	54
2.1 Материалы.....	54
2.1.1 Биорезорбируемые материалы.....	54

2.1.2 Нерезорбируемые материалы	54
2.2 Получение электропроводящих композитных материалов и образцов на их основе	55
2.2.1 Получение композитных материалов на основе хитозана и ОСУНТ	55
2.2.2 Получение композитных материалов на основе полиимида и графена	56
2.3 Методы исследования	58
2.3.1 Механические испытания	58
2.3.2 Электронная сканирующая микроскопия	59
2.3.3 Атомно-силовая микроскопия	59
2.3.4 Исследование химического состава поверхности методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии	60
2.3.5 Измерение угла смачивания	60
2.3.6 Исследование электрофизических характеристик	61
2.3.7 Клеточные исследования <i>in vitro</i>	63
2.3.8 Экспериментальная установка для исследования влияния электрического поля на жизнедеятельность клеток	67
2.3.9 Выбор параметров и экспериментальных схем электростимуляции клеточных культур <i>in vitro</i>	69
2.3.10 Методика проведения электростимуляции клеток на плёночных матрицах <i>in vitro</i>	73
2.3.11 Исследование жизнедеятельности и пролиферативных особенностей клеток с помощью клеточного анализатора iCELLigence	75
2.3.12 Оценка морфологии и цитоскелета клеток методом флуоресцентной микроскопии	79

2.3.13 Электростимуляция <i>in vivo</i>	80
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	85
3.1. Механические свойства композиционных плёнок	85
3.2 Структура композиционных плёнок	89
3.3 Исследование топографии поверхности композиционных плёночных материалов методом атомно-силовой микроскопии	93
3.3.1 Топография поверхности плёнок хитозана-ОСУНТ	93
3.3.2 Топография поверхности плёнок полиимида Р-ОДФО и графена	97
3.4 Анализ химического состава поверхности композиционных плёнок	100
3.5 Гидрофильность композиционных плёнок.....	103
3.6 Электропроводность композиционных плёнок	104
3.7 Вольт-амперные характеристики плёночных композиционных материалов в сухом состоянии и в физиологическом растворе	107
3.7.1 Вольт-амперные характеристики плёнок хитозан-ОСУНТ	107
3.7.2 Вольтамперные характеристики плёнок полиимид-графен	111
3.8 Исследование биосовместимости материалов <i>in vitro</i>	113
3.9 Влияние электростимуляции на динамику роста клеточных культур по данным RTCA	116
3.9.1 Электростимуляция клеток на поверхности композитных плёнок хитозан-ОСУНТ.....	117
3.9.2 Электростимуляция клеток на поверхности композитных плёнок полиимид-графен.....	119
3.9.3 Электростимуляция клеток в комбинированной двухслойной системе.....	121

3.10 Влияние электростимуляции на морфологию клеток	126
3.11 Влияние электрического поля на кинетику заживления ран в экспериментах <i>in vivo</i>	130
ВЫВОДЫ	137
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	139
БЛАГОДАРНОСТИ	159

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВКМ – внеклеточный матрикс

УНТ – углеродные нанотрубки

ОСУНТ – одностенные углеродные нанотрубки

3D – 3-dimensional (трехмерный)

2D – 2-dimensional (двумерный)

AuNM – наноматериалы из золота

ППи – полипиррол

ПАНИ – полианилин

ПЭДОТ – поли(3,4-этилендиокситиофен)

ПЛА – полилактид

ПКЛ – поликапролактон

ПИ – полиимид

ПУ – полиуретан

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

АСМ – атомно-силовая микроскопия

РФЭС – рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия

МТТ – 3-(4,5 диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид

DMEM – dulbecco's modified eagle medium (Модифицированная среда Игла Дульбекко)

ДМСО – диметилсульфоксид

ПАК – полиамидокислота

ДМАА – диметилацетамид

ФР – физиологический раствор

CI – Cell Index, клеточный индекс

E – модуль упругости

σ_p – разрывная прочность

ϵ_p – относительная деформация при разрыве

R_z – максимальный перепад высот

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия наблюдается устойчивый рост интереса к созданию и применению функциональных полимерных композиционных материалов в области биомедицинских технологий. Одним из перспективных направлений является разработка материалов для тканеинженерных конструкций, предназначенных для восстановления повреждённых тканей. Наряду с применением лекарственных веществ для ускорения заживления ран, исследуются способы физического воздействия на ткани. Их использование требует создания материалов, свойства которых соответствуют выбранному способу воздействия.

Одним из таких способов является электростимуляция. Электрические сигналы участвуют в естественных процессах восстановления тканей после повреждений, а внешнее электрическое воздействие может стимулировать и увеличивать эффективность заживления ран [1]. Для его применения необходимы электропроводящие полимерные материалы, обеспечивающие передачу электрического воздействия в раневую область с учётом параметров стимуляции и условий использования.

Биомедицинское назначение таких материалов предъявляет требования к сочетанию их свойств. Помимо необходимых электрических характеристик, материалы должны быть биосовместимыми и обладать механической прочностью и способностью к деформированию, необходимыми для сохранения целостности и контакта с раневой поверхностью. Полимерные композиты позволяют регулировать эти характеристики посредством выбора химической природы матрицы, типа и содержания наполнителя, а также условий получения [2]. При этом выбор состава композита требует оценки совокупности его электрических, механических и поверхностных характеристик в соответствии с назначением материала [3].

К настоящему времени достаточно подробно изучены синтетические проводящие полимеры – полипиррол, полианилин, поли(3,4-этилендиокситиофен) (ПЭДОТ), а также углеродные наноматериалы – графен и углеродные нанотрубки.

Исследованы их электрические и морфологические характеристики, возможность введения в полимерные матрицы, включая природные хитозан, коллаген и желатин [4]. Показана перспективность применения получаемых материалов в тканевой инженерии и системах электростимуляции.

В то же время исследования в данной области носят фрагментарный характер. Значительная часть работ посвящена отдельным аспектам биологического действия электропроводящих материалов, тогда как взаимосвязи их состава, структуры, механических, электрических и поверхностных свойств остаются недостаточно изученными. Ограничен также объём экспериментальных данных, позволяющих сопоставить результаты испытаний *in vitro* и *in vivo* и обосновать выбор материалов для практического применения [5].

Потребность в материалах, отвечающих совокупности перечисленных требований, определяет необходимость разработки новых полимерных композитов с заданным комплексом свойств. С учётом изложенного, в настоящей диссертационной работе предложен подход к созданию композиционных материалов для электростимуляции с целью ускорения заживления кожных ран. В качестве полимерных матриц выбраны хитозан и полиимид Р-ОДФО, а для модификации их электрических свойств использовали одностенные углеродные нанотрубки (ОСУНТ) и графен соответственно. Выбор хитозана обусловлен его биосовместимостью, а полиимида Р-ОДФО – возможностью получения механически прочных плёнок для проводящего слоя.

В настоящей работе предложена новая конструкция двухслойного раневого покрытия, сочетающего полиимид-графеновый композит и хитозановую плёнку. Разделение функций между полимерными слоями позволяет подбирать их свойства в соответствии с назначением и обеспечивать необходимый комплекс характеристик покрытия для электростимуляции раневой области.

Таким образом, актуальность работы определяется необходимостью разработки новых электропроводящих полимерных композиционных материалов с комплексом свойств, соответствующим условиям биомедицинского применения. Для обоснования возможности их использования в системах электростимуляции

необходимо установить взаимосвязи между составом, структурой, механическими, поверхностными и электрическими характеристиками, а также оценить биологическое действие материалов в исследованиях *in vitro* и *in vivo*.

Целью настоящей работы является разработка электропроводящих плёночных композиционных материалов на основе хитозана с одностенными углеродными нанотрубками и полиимида Р-ОДФО с графеном, исследование их структуры, механических, электрофизических и биологических свойств, а также оценка возможности их применения для электростимуляции клеток кожи *in vitro* и заживления экспериментальных ран *in vivo*.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- получение плёночных композиционных материалов на основе хитозана с одностенными углеродными нанотрубками и полиимида Р-ОДФО с графеном;
- исследование структуры, свойств поверхности, механических и электрофизических характеристик полученных материалов в зависимости от содержания наполнителя;
- разработка экспериментальной ячейки для исследования влияния электростимуляции *in vitro*;
- оценка влияния полученных материалов на жизнеспособность, адгезию и пролиферацию клеток кожи (дермальных фибробластов и кератиноцитов); исследование ответа этих клеток на электростимуляцию при различных параметрах воздействия;
- разработка и получение нового двухслойного полимерного композита, который может использоваться в качестве раневого покрытия для электростимуляции;
- проведение экспериментов *in vivo* и оценка влияния электростимуляции с использованием разработанной системы на заживление полнослойных кожных ран у лабораторных животных.

Методы исследования. В основе методологии диссертации лежит комплексный подход к изучению электропроводящих полимерных

композиционных материалов, включающий их синтез, физико-химические характеристики, исследование взаимодействия с клетками кожи человека в условиях *in vitro*, а также проверку эффективности в моделях *in vivo*. Исследование опирается на современные представления материаловедения, клеточной биологии и биомедицинской инженерии, что позволило рассматривать объект исследования как многокомпонентную систему, свойства которой определяются как составом и структурой, так и условиями биологического применения.

Исследование структуры, механических и электрических свойств полимерных материалов было осуществлено с использованием современного лабораторного оборудования, а именно: сканирующая электронная микроскопия (Carl Zeiss Supra-55, Германия), атомно-силовая микроскопия (SOLVER PRO, НТ-МДТ, Россия), разрывная машина (Instron 5940, США), установка DSA30 (Krüss GmbH, Германия) для определения угла смачиваемости, прибор Elins P40 (Россия) для определения электропроводности. Биосовместимость материалов *in vitro* была исследована с помощью МТТ-теста, а эффективность электростимуляции оценивали с помощью системы RTCA iCELLigence (ACEA Biosciences, США) и флуоресцентной микроскопии (Axio Scope.A1, ZEISS, Германия).

Научная новизна работы заключается в следующем:

- разработаны и получены новые композиционные материалы на основе хитозана и ОСУНТ и полиимида Р-ОДФО и графена, а так же определены составы композитов, обладающих комплексом свойств, необходимым для эффективной электростимуляции;
- в разработанной экспериментальной ячейке получены данные об электрическом отклике композитов, позволившие выбрать рабочие параметры электростимуляции;
- для исследованных материалов впервые установлена зависимость клеточного ответа от состава композита и параметров электростимуляции;

- предложена и апробирована двухслойная система, в которой проводящий полиимид-графеновый слой отделён от клеток биосовместимым хитозановым слоем, непосредственно контактирующим с ними;
- впервые применено двухслойное раневое покрытие на основе полиимид-графенового и хитозанового слоёв для электростимуляции полнослойных кожных ран.

Практическая значимость работы:

- полученные плёночные материалы сохраняют структурную целостность и функциональность при стерилизации и использовании в жидкостях (культуральной среде и тканевой жидкости), являются биосовместимыми, что позволяет применять их в клеточных экспериментах и при использовании раневых покрытий;
- предложены критерии выбора материала для электростимуляции с учётом его проводимости, механических свойств и биосовместимости;
- разработана экспериментальная установка с тефлоновой ячейкой и платиновыми электродами, позволяющая проводить электростимуляцию клеток кожи человека, культивируемых на полимерных композиционных материалах;
- разработан протокол испытаний *in vitro*, позволяющий сопоставлять реакцию клеток кожи (дермальных фибробластов и кератиноцитов) на электростимуляцию при заданных параметрах сигнала;
- изготовлен опытный образец двухслойного раневого покрытия, использованный для электростимуляции экспериментальных кожных ран у животных.

Положения, выносимые на защиту:

- для композитов хитозан-ОСУНТ и полиимид-графен определены оптимальные концентрации компонентов, обеспечивающие поддержание жизнеспособности клеток кожи человека и передачу электрического воздействия. Повышение содержания наполнителя и электропроводности выше определенных в

исследовании оптимальных значений не улучшает биологический ответ при электростимуляции;

- при использовании разработанных материалов электростимуляция П-образным переменным напряжением с амплитудой 100 мВ и сменой полярности каждые 30 с в течение 4 ч повышает пролиферативную активность дермальных фибробластов и кератиноцитов HaCaT по сравнению с контролем без электрического воздействия;
- двухслойное раневое покрытие с проводящим полиимид-графеновым слоем, отделённым от раневой поверхности хитозановой плёнкой, обеспечивает электростимуляцию без непосредственного контакта проводящего композита с раной, а плёнка на основе хитозана создает биоэлектронный интерфейс, контактирующий с живыми тканями. Применение такой гибридной системы для электростимуляции ускоряет закрытие полнослойных кожных ран у крыс в исследованной экспериментальной модели.

Личный вклад автора. Лично автором были выполнены анализ и обобщение имеющихся литературных данных по теме диссертационного исследования, поставлены цели и задачи работы, осуществлен синтез полимерных матриц и получение электропроводящих композиционных материалов на их основе, а также проведено исследование свойств этих материалов. Автор освоил методики и интерпретировал результаты оценки жизнеспособности и пролиферации клеток (фибробластов и кератиноцитов) методами МТТ-теста, импедансного анализа на системе RTCA iCELLigence и флуоресцентной микроскопии, принимал непосредственное участие в анализе и обработке результатов исследования, написании научных статей.

Обоснованность и достоверность полученных результатов подтверждается их согласованностью, применением комплекса современных, взаимодополняющих исследовательских методов, анализа и статистической обработки данных, а также сопоставлением полученных данных с имеющимися литературными источниками.

Работа выполнена в лаборатории «Механики полимеров и композиционных материалов» филиала НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ – ИВС при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-73-30003 «Электропроводящие полимерные материалы для тканевой инженерии».

Апробация результатов диссертационного исследования. Основные результаты диссертационной работы были представлены на 7-й Международной школе-конференции «Saint Petersburg OPEN 2020: Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures» (г. Санкт-Петербург, 2020), Молодежной школе-конференции «Тканеинженерные конструкции и материалы для биомедицины» (г. Санкт-Петербург, 2022), XVIII, XIX Международной научно-практической конференции «Новые полимерные композиционные материалы. Микитаевские чтения» (2022, 2023), Международной научно-технической конференции «Полимерные композиты и трибология» (ПОЛИКОМТРИБ-2022; г. Гомель, Беларусь, 2022), III, V Всероссийской научно-практической конференции «Политех наукам о жизни» (г. Санкт-Петербург, 2023, 2025) и XXXVI симпозиуме «Современная химическая физика» (г. Туапсе, 2024).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, входящих в базу данных Web of Science и SCOPUS, 8 тезисов докладов.

Структура работы. Диссертационная работа изложена на 159 страницах и содержит 48 рисунков, 8 таблиц и 181 источник литературы. Структура работы включает введение, три главы (обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты и обсуждение), выводы и список литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современное состояние проблемы регенерации кожи

Кожа является крупнейшим органом человеческого тела, выполняющим защитную функцию от воздействия неблагоприятных внешних факторов на внутренние ткани и органы. Раной кожи называют нарушение её нормальной анатомической структуры и функций, сопровождающееся разрушением локального микроокружения тканей [6]. Повреждения кожи могут возникать в результате острых травм, таких как разрезы, ссадины или ожоги, а также вследствие хронических заболеваний, например, диабетических или венозных язв [7].

В развитых странах до 15 % обращений за медицинской помощью связано с повреждениями кожных покровов различного характера, а расходы на их лечение составляют от 3 до 6 % бюджета здравоохранения [8]. Каждый год стоимость лечения повреждений кожи возрастает. Характер течения раневого процесса, частота перевязок и вероятность являются ключевыми факторами, определяющими сроки заживления и, соответственно, затраты на терапию.

В связи с этим восстановление повреждённых участков кожи до нормального состояния является крайне актуальной и приоритетной задачей [9]. С углублением понимания механизмов заживления подходы к терапии хронических ран эволюционировали от простого удаления некротизированных тканей и наложения повязок к более сложным стратегиям, основанным на воздействии на микроокружение повреждённых тканей [10]. Эффективность терапии на современном этапе оценивается не только по скорости заживления, но и по качеству полученного результата. Важную роль играют эстетический эффект и комфортность лечения, что позволяет сочетать оптимальные терапевтические исходы с высоким уровнем качества жизни пациента [11].

Таким образом, высокая распространённость кожных повреждений, их значимое социально-экономическое бремя и риск хронического течения обуславливают необходимость глубокого понимания механизмов репарации. Заживление ран представляет собой сложный биологический процесс,

включающий скоординированное взаимодействие различных клеточных популяций, сигнальных молекул и структур внеклеточного матрикса. Для системного анализа традиционно выделяют несколько последовательных фаз заживления, каждая из которых имеет специфические механизмы и ключевые регуляторные звенья.

1.1.1 Фазы заживления кожи

Заживление кожных ран представляет собой сложный, многоэтапный процесс, включающий последовательную смену фаз: коагуляции, воспаления, пролиферации и ремоделирования (Рисунок 1.1). Каждая из этих стадий характеризуется участием определённых клеточных популяций, медиаторов и ремоделирующих механизмов, которые в совокупности обеспечивают восстановление целостности кожного покрова.

Фаза гемостаза (коагуляции) наступает сразу после повреждения и длится от нескольких минут до часов. Её основная задача – остановка кровотечения и формирование первичного барьера. Наиболее важную роль в остановке кровотечений играют тромбоциты. Агрегируя белковые компоненты крови, они формируют первичный коагуляционный тромб, а также высвобождают различные сигнальные молекулы, такие как цитокины и факторы роста, информирующие организм об опасности и запускающие дальнейшие этапы регенерации [12]. Такая первичная сосудисто-тромбоцитарная реакция предотвращает дальнейшие кровопотери и препятствует последующему попаданию загрязнений в рану.

Воспалительная стадия заживления следует за фазой гемостаза. На данной стадии организм справляется с инфекцией, очищает рану от поврежденных белков и клеток, и создает условия для последующего восстановления покровных тканей. Воспаление начинается примерно через сутки после ранения и может продолжаться достаточно долго. Раневой процесс, «застывший» на стадии воспаления, называется трофическим. В этот период в зону повреждения мигрируют нейтрофилы, макрофаги и лимфоциты, которые осуществляют фагоцитоз некротических тканей и микробных агентов. Одновременно они выделяют

провоспалительные цитокины, а также ростовые факторы, активирующие фибробласты и эндотелиальные клетки [13].

Пролиферативная стадия заживления ран, характеризуется активным ростом и размножением клеток, образованием новой ткани, развитием сосудов (ангиогенезом) и восстановлением внеклеточного матрикса (ВКМ). Фаза пролиферации обычно начинается на 3 – 4 сутки и может продолжаться до двух недель, она является критической для формирования устойчивого заживления. На данном этапе ведущую роль играют фибробласты и кератиноциты [14]. Фибробласты синтезируют коллаген I и III типов, фибронектин и гликозаминогликаны, формируя грануляционную ткань. Кератиноциты мигрируют из краёв раны, обеспечивая эпителизацию. Одновременно происходит ангиогенез, стимулируемый факторами роста.

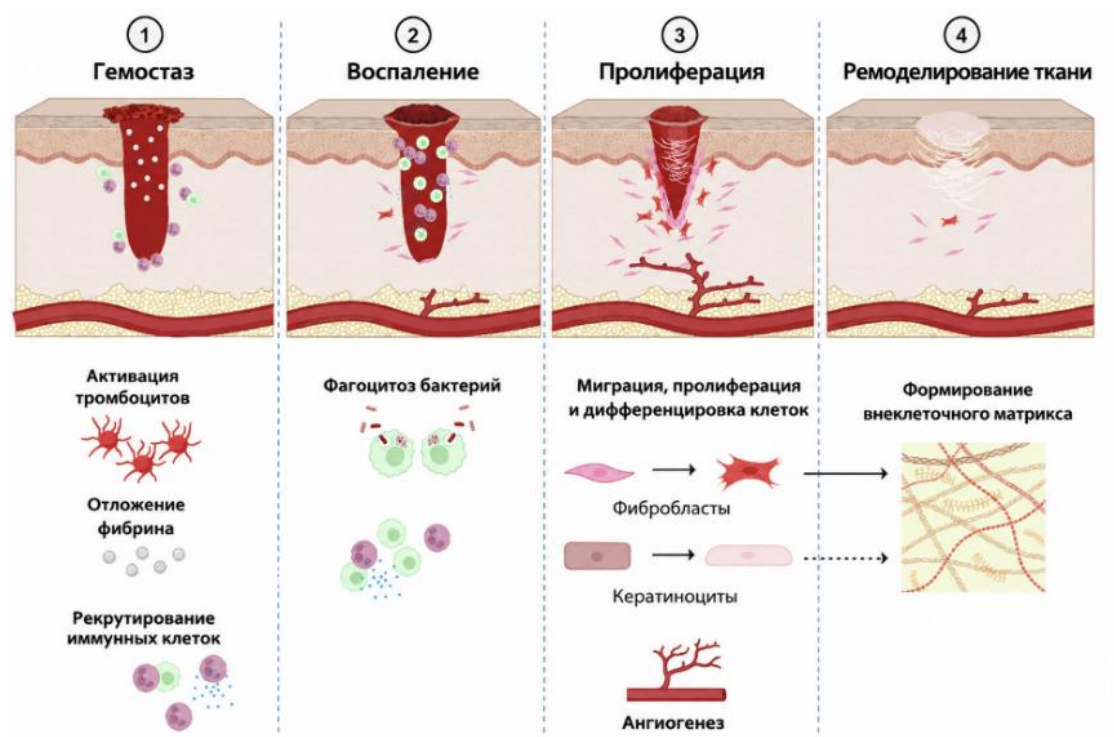


Рисунок 1.1 – Стадии заживления кожных ран

Фаза ремоделирования раны, является финальным завершающим этапом процесса заживления покровной ткани и длится от нескольких недель до месяцев. В этот период происходит перестройка коллагеновых волокон: замена коллагена III на более прочный коллаген I, формирование организованного внеклеточного

матрикса и преобразование грануляционной ткани в зрелую, структурно организованную ткань с восстановлением прочности, эластичности и функциональности. В результате формируется зрелый рубец с восстановлением механической прочности кожи [15].

Каждая фаза заживления кожи обеспечивается сложным взаимодействием клеточных и молекулярных механизмов, направленных на восстановление целостности тканей. При этом важную роль в регуляции этих процессов играют не только биохимические, но и биофизические факторы. Ещё в XIX веке было показано существование эндогенных электрических полей в области повреждений, которые формируются за счёт ионных градиентов и трансэпителиальных потенциалов [16]. Эти поля оказывают влияние на миграцию клеток, ангиогенез и ремоделирование внеклеточного матрикса, выступая естественным регулятором репарации.

Осознание роли эндогенных электрических сигналов привело к развитию концепции экзогенной электрической стимуляции как метода ускорения заживления ран. В ряде исследований показано, что направленное воздействие электрического тока способно усиливать миграцию фибробластов и кератиноцитов, стимулировать ангиогенез и сокращать сроки репарации [17]. В связи с этим экзогенная электрическая стимуляция рассматривается как перспективный подход к терапии хронических и трудно заживающих повреждений кожи.

1.1.2 Биоэлектрические сигналы кожи и экзогенная электростимуляция

Наряду с биохимическими и механическими факторами, в регуляции заживления кожи важную роль играют биоэлектрические сигналы. В интактном эпидермисе существует трансэпителиальная разность потенциалов, которая формируется за счёт направленного транспорта ионов через поляризованные эпителиальные клетки. В поддержании этого потенциала участвуют ионные каналы, насосы и переносчики, расположенные на апикальной и базальной мембранах клеток. При повреждении кожного покрова целостность эпителиального барьера нарушается, и существующий ионный градиент локально

«замыкается» в области раны. В результате формируется эндогенное электрическое поле, ориентированное от неповреждённых тканей к зоне дефекта [18 – 22].

Методами прямых измерений было показано, что в ранах кожи животных и человека возникает электрическое напряжение порядка 10 – 60 мВ, что стало основой для представления о так называемой «кожной батарее» [19]. Согласно этой концепции, эпидермис функционирует как естественная биоэлектрическая система: в норме он поддерживает устойчивый потенциал, а при повреждении создаёт локальный ток в области раны. Интенсивность такого поля уменьшается по мере удаления от края дефекта, поэтому наиболее выраженное электрическое воздействие приходится на область, где активно происходят миграция клеток, восстановление эпидермиса и формирование новой ткани.

Для процесса заживления это имеет принципиальное значение. Электрическое поле способно задавать направление клеточной миграции, то есть вызывать гальванотаксис. Кератиноциты и фибробласты воспринимают электрический сигнал и изменяют направление движения, что способствует закрытию раневого дефекта [23]. Кроме того, эндогенные электрические поля участвуют в регуляции пролиферации клеток, синтеза компонентов внеклеточного матрикса и общего состояния клеточного микроокружения [24]. Поэтому биоэлектрические сигналы можно рассматривать не как побочный эффект повреждения, а как один из физиологических механизмов, сопровождающих репарацию кожи.

Однако, при обширных, хронических или осложнённых повреждениях естественные биоэлектрические механизмы могут быть недостаточны для полноценного восстановления ткани [25, 26]. В таких случаях нарушается не только барьерная функция кожи, но и нормальная организация раневого микроокружения: замедляется миграция клеток, поддерживается длительное воспаление, ухудшается формирование грануляционной ткани и эпителизация. Это стало предпосылкой для развития подходов, основанных на экзогенной электрической стимуляции, то есть на подведении к повреждённой ткани внешнего электрического сигнала с контролируемыми параметрами [21, 27].

Экзогенная электростимуляция направлена на воспроизведение или усиление естественных биоэлектрических сигналов, возникающих при заживлении. В экспериментальных и клинических исследованиях показано, что низкоинтенсивные электрические поля могут ускорять миграцию кератиноцитов и фибробластов, усиливать пролиферацию клеток, стимулировать образование внеклеточного матрикса и способствовать более быстрому закрытию дефекта [28 – 30]. На моделях кожных ран у животных применение электрического воздействия приводило к ускоренному уменьшению площади раны, усилению васкуляризации и более упорядоченной организации коллагеновых волокон [31]. В клинической практике электростимуляция также рассматривается как перспективный дополнительный метод при лечении хронических и трудно заживающих ран [32].

Клетками-мишенями при электростимуляции кожи в первую очередь являются дермальные фибробласты и кератиноциты. Фибробласты участвуют в формировании грануляционной ткани, синтезе коллагена, фибронектина и других компонентов внеклеточного матрикса, поэтому их активность во многом определяет механическую прочность и качество восстановленной ткани [33]. Под действием электрического поля фибробласты могут изменять морфологию, поляризоваться в направлении приложенного поля и активнее мигрировать в область повреждения. Этот эффект связан с перестройкой цитоскелета, изменением организации актиновых филаментов и формированием клеточных выростов, участвующих в направленном движении [34].

Кератиноциты, в свою очередь, обеспечивают восстановление эпидермального барьера [35]. Они мигрируют из краёв раны, пролиферируют и формируют новый покровный слой. Под действием низкоинтенсивного электрического поля обе клеточные популяции способны изменять скорость миграции, пролиферативную активность и характер взаимодействия с окружающим матриксом [36]. Поэтому оценка ответа фибробластов и кератиноцитов является одной из наиболее информативных моделей при разработке материалов для электростимуляции кожи.

На клеточном уровне электрическое поле воспринимается через изменение состояния плазматической мембраны, перераспределение ионов, перестройку цитоскелета и изменение активности сигнальных путей. В литературе описано участие кальциевого гомеостаза, MAPK-, PI3K/АКТ- и FAK-зависимых механизмов в ответе клеток на электрическое воздействие [30]. Вместе с тем для задач настоящей работы принципиально не детальное рассмотрение всех внутриклеточных каскадов, а сам факт того, что электрический сигнал способен изменять ключевые для заживления параметры клеточного поведения: адгезию, миграцию, пролиферацию и синтетическую активность фибробластов и кератиноцитов.

Электрическое воздействие может проявляться не только на уровне отдельных клеток, но и на уровне всего раневого процесса. В литературе описано его участие в регуляции воспалительной реакции, ангиогенеза, формирования грануляционной ткани и последующего ремоделирования внеклеточного матрикса [37, 38]. В частности, электростимуляция может способствовать более быстрому переходу от воспалительной стадии к пролиферативной, усилению васкуляризации, повышению синтетической активности фибробластов и более упорядоченному отложению коллагеновых волокон [39]. Эти эффекты важны не только для ускорения закрытия дефекта, но и для повышения качества регенерации, поскольку чрезмерное или нарушенное ремоделирование может приводить к формированию грубого рубца [40].

При этом результат электростимуляции зависит не только от самого факта подачи тока, но и от параметров воздействия. Существенное значение имеют амплитуда напряжения, сила тока, частота, длительность стимуляции, форма сигнала и способ контакта с биологической средой [41]. Слишком слабое воздействие может не вызывать выраженного клеточного ответа, тогда как избыточная сила тока способна приводить к повреждению клеток, локальному изменению pH, накоплению продуктов электрохимических реакций и усилению оксидативного стресса [42]. Поэтому для биомедицинского применения особенно

важны режимы, близкие к физиологическим диапазонам биоэлектрических сигналов кожи [43].

Таким образом, положительный эффект электростимуляции возможен только при корректно подобранных параметрах воздействия и безопасном способе передачи электрического сигнала к клеткам. Для практического применения необходим не только источник электрического сигнала, но и материал-интерфейс, который обеспечивает равномерное распределение поля, поддерживает жизнеспособность клеток и сохраняет стабильность в водной физиологической среде [44, 45]. Поэтому разработка биосовместимых электропроводящих материалов является необходимым условием для управляемой и воспроизводимой электростимуляции клеток кожи [46].

1.1.3 Требования к материалам для электростимуляции клеток кожи

Рассмотрение биоэлектрических сигналов кожи показывает, что электрическое поле может быть одним из факторов, влияющих на миграцию, адгезию и пролиферацию клеток в процессе заживления. Однако, сам по себе источник электрического сигнала ещё не обеспечивает эффективного и безопасного воздействия на клетки. Между прибором и биологической системой должен находиться материал, способный передавать электрический сигнал в водной и ионной среде, не нарушая жизнеспособность клеток и не вызывая нежелательных электрохимических реакций [47, 48]. Такой материал выполняет роль биоэлектрического интерфейса. С одной стороны, он контактирует с клетками или тканью, а с другой, должен обеспечивать подведение и распределение электрического поля [49].

Поэтому, разработка материалов для электростимуляции клеток кожи является не вспомогательной, а одной из центральных задач данного направления. От свойств материала зависит, каким будет электрическое воздействие на клетки: равномерным или локальным, физиологичным или повреждающим, воспроизводимым или нестабильным. Материал должен одновременно поддерживать клеточную адгезию и пролиферацию, сохранять стабильность в культуральной или физиологической среде и обеспечивать контролируемый

перенос заряда [50]. Именно в этом заключается переход от биологического понимания роли электрических сигналов в заживлении кожи к материаловедческой задаче создания биосовместимых электропроводящих систем [51].

Если рассматривать электростимуляцию как инструмент управления клеточным ответом, то материал должен выполнять две взаимосвязанные функции. Во-первых, он является частью клеточного микроокружения и поэтому должен быть совместим с биологической средой. А во-вторых, должен являться элементом электрической цепи, через который к клеткам подводится дозированное воздействие [52]. По этой причине требования к таким материалам носят комплексный характер и не сводятся только к высокой электропроводности [53].

В первую очередь материал должен быть биосовместимым. Для систем, вступающих в прямой или опосредованный контакт с клетками кожи или раневой поверхностью, это базовое условие. Материал не должен оказывать цитотоксического действия, ухудшать адгезию и распластывание клеток, вызывать выраженное раздражение или провоцировать неблагоприятный воспалительный ответ [54]. Кроме того, важна безопасность продуктов возможной деградации, вымывания компонентов или изменения поверхностного состава при нахождении материала в водной среде [55]. Для задач электростимуляции это особенно существенно, поскольку биологический ответ определяется не только химической природой материала, но и тем, как он ведёт себя при подаче электрического сигнала.

Вторым ключевым требованием является контролируемая электропроводность. Материал должен обеспечивать передачу электрического воздействия к клеткам, но при этом не создавать условий для локальной перегрузки, перегрева, выраженного изменения pH или неконтролируемых электрохимических реакций [56]. В данном случае важна не максимальная проводимость как таковая, а её соответствие выбранному режиму стимуляции и стабильность во времени. Материал должен работать в физиологически приемлемом диапазоне токов и напряжений, обеспечивая воспроизводимое распределение поля на границе с клеточным слоем.

Особое значение имеет поведение материала в водной и ионной среде. Клеточные исследования и раневые модели всегда связаны с присутствием культуральной среды, физиологического раствора или тканевой жидкости. В этих условиях перенос заряда может осуществляться не только электронным, но и ионным механизмом [57]. Поэтому материал для электростимуляции должен сохранять электрические характеристики после увлажнения, не разрушаться, не набухать чрезмерно и не терять контакт с электродами или тканью [58]. Для полимерных композиционных систем это требование особенно важно, поскольку введение проводящего наполнителя может существенно менять как электрофизические свойства, так и взаимодействие материала с водой [59, 60].

Не менее важны механические свойства. Кожа является мягкой и деформируемой тканью, поэтому материал, контактирующий с клетками или раневой поверхностью, должен быть достаточно гибким и конформным [61]. Слишком жёсткая или хрупкая подложка может нарушать контакт с поверхностью, создавать локальные зоны давления и приводить к неравномерному распределению электрического поля. С другой стороны, чрезмерно мягкий или нестабильный материал может терять форму, повреждаться при манипуляциях или разрушаться в процессе лечения. Поэтому оптимальным является сочетание механической прочности, гибкости и стабильности в условиях увлажнения [62].

Существенную роль играют поверхностные характеристики материала, такие как гидрофильность, заряд, шероховатость и химический состав поверхностного слоя [63]. Именно поверхность первой взаимодействует с белками среды и клетками, определяя начальную адгезию, распластывание и дальнейшую их пролиферацию [64]. Для электростимуляции клеток кожи предпочтительна поверхность, которая хорошо смачивается водной средой, но при этом не теряет стабильность структуры. Развитая микро- или нанотопография может способствовать клеточной адгезии за счёт увеличения площади контакта и формирования дополнительных участков прикрепления [65]. Однако, чрезмерно выраженный рельеф, острые выступы или неоднородное распределение

проводящего наполнителя могут, напротив, ухудшать равномерное распластывание клеток и создавать локальные зоны неблагоприятного воздействия [66].

Отдельно следует учитывать устойчивость материала к стерилизации и возможность воспроизводимого изготовления. Для применения в клеточных и биомедицинских технологиях материал должен сохранять структуру, электропроводность, механические свойства и поверхностные характеристики после стерилизующей обработки [67, 68]. Если материал демонстрирует хорошие свойства только в лабораторном образце, но не выдерживает стерилизацию или плохо воспроизводится от партии к партии, его практическая ценность существенно ограничена [69]. Поэтому технологичность получения, однородность распределения проводящей фазы и стабильность состава являются такими же важными характеристиками, как биосовместимость и электропроводность.

Материал для электростимуляции клеток кожи нельзя рассматривать только как проводящую подложку. Его электропроводность определяет величину тока при приложении внешнего напряжения, а биосовместимость необходима для сохранения жизнеспособности клеток. Важны и свойства поверхности. Смачиваемость и топографию следует оценивать с учетом их влияния на адгезию и распластывание клеток [70].

Плѐнка должна сохранять целостность при размещении в экспериментальной камере и в течение культивирования. При выборе материала необходимо учитывать его набухание и изменение электрических характеристик в водной среде. Получение и подготовка образцов должны обеспечивать сопоставимые толщину, состояние поверхности и электропроводность плѐнок. Совокупность этих характеристик (Таблица 1.1) определяет пригодность материала для культивирования клеток и проведения электростимуляции. При этом параметры электрического воздействия задаются внешним источником и схемой подключения электродов.

Таблица 1.1 – Основные требования к материалам для электростимуляции клеток кожи

Требование	Значение для электростимуляции	Возможные проблемы при несоблюдении
Биосовместимость	Материал должен поддерживать адгезию, распластывание и пролиферацию клеток	Цитотоксичность, воспалительный ответ, ухудшение клеточного роста
Достаточная электропроводность	Обеспечивает передачу электрического сигнала через композиционный материал без необходимости увеличения приложенного напряжения	Недостаточная передача электрического сигнала при низкой электропроводности материала
Стабильность во влажной среде	Материал должен сохранять свойства в культуральной среде, физиологическом растворе или тканевой жидкости	Набухание, разрушение, потеря контакта с электродами, нестабильный ток
Механическая гибкость	Позволяет сохранять плотный контакт с мягкой и деформируемой тканью	Неравномерное поле, локальное давление, повреждение материала
Поверхностные свойства	Гидрофильность, заряд, шероховатость и химический состав определяют начальную адгезию клеток	Плохое распластывание клеток, локальные зоны неблагоприятного воздействия
Устойчивость к стерилизации	Материал должен сохранять структуру и свойства после обработки	Потеря проводимости, изменение поверхности, невозможность применения в биомедицинских условиях
Воспроизводимость изготовления	Нужна стабильная толщина, состав и распределение проводящей фазы	Разброс свойств между образцами, плохая сопоставимость экспериментов

В этом отношении особый интерес представляют полимерные композиционные материалы, поскольку они позволяют сочетать свойства полимерной матрицы и функционального проводящего наполнителя. Полимерная

основа обеспечивает форму, гибкость, биосовместимость и взаимодействие с клетками, тогда как проводящий компонент отвечает за формирование путей переноса заряда [71]. За счёт изменения природы матрицы, концентрации наполнителя, структуры поверхности и условий получения можно направленно регулировать электрические, механические и биологические характеристики материала. Именно поэтому полимерные композиционные системы являются перспективной платформой для создания материалов, предназначенных для электростимуляции клеток кожи и разработки биоэлектрических интерфейсов для регенеративных технологий [72, 73].

1.2 Полимерные материалы как основа биоэлектронных и тканеинженерных систем

Полимерная матрица в регенеративных материалах задаёт не только форму изделия, но и его базовую биосовместимость, механические характеристики и характер контакта с раневой поверхностью [74]. Для систем электростимуляции эта роль становится ещё более значимой. Матрица влияет на распределение электрического поля, стабильность интерфейса «материал – электролит», поведение материала во влажной среде и воспроизводимость его свойств при длительном контакте с клетками или тканью [75].

В связи с этим в биоэлектронных и тканеинженерных системах применяют как природные, так и синтетические полимеры (Таблица 1.2). К природным полимерам относятся хитозан, коллаген, желатин, альгинат, гиалуроновая кислота, целлюлоза и её производные [76]. Их основное преимущество связано с высокой биосовместимостью, гидрофильностью и способностью поддерживать взаимодействие с клетками. Синтетические полимеры, включая полиуретаны [77], биоразлагаемые полиэфиры [78] и полиимиды [80], применяют для получения механически прочных и технологичных конструкций с заданным сроком эксплуатации. Фторполимеры, в частности поливинилиденфторид и политетрафторэтилен [79], отличаются высокой химической устойчивостью. Однако их исходная поверхность плохо смачивается, поэтому для взаимодействия

с клетками обычно требуется модификация поверхности или нанесение гидрофильного покрытия.

Выбор полимерной матрицы определяется предполагаемой функцией материала. В одних случаях требуется биорезорбция, участие материала в ремоделировании ткани и формирование благоприятного клеточного микроокружения. В других – важнее стабильность формы, устойчивость к водной среде, сохранение механических и электрических характеристик при длительной эксплуатации [81]. Поэтому разработка материалов для электростимуляции клеток кожи требует сравнительного анализа как природных, так и синтетических полимерных систем.

Таблица 1.2 – Сравнительная характеристика полимерных матриц для регенеративных и биоэлектронных систем

Группа полимеров	Представители	Основные преимущества	Значение для систем электростимуляции
Природные полимеры	Хитозан, коллаген, желатин, альгинат, гиалуроновая кислота, целлюлоза и её производные	Высокая биосовместимость, гидрофильность, поддержка клеточной адгезии и взаимодействия	Формируют благоприятный клеточный интерфейс, однако могут уступать синтетическим материалам по механической прочности и долговременной стабильности
Синтетические полимеры	Полиуретаны, биоразлагаемые полиэфиры, фторполимеры, полиимиды	Механическая прочность, химическая устойчивость, технологичность, долговременная стабильность	Обеспечивают стабильность конструкции и воспроизводимость свойств, что особенно важно при длительной электростимуляции

1.2.1 Природные полимеры для регенеративных материалов

Природные полимеры широко применяются при создании материалов для регенеративной медицины, поскольку по своей химической природе и поверхностным свойствам они ближе к биологическому микроокружению клеток, чем большинство синтетических полимеров [82]. Такие материалы способны поддерживать адгезию клеток, удерживать воду, формировать мягкие матрицы и покрытия, а также обеспечивать более физиологичный контакт с тканью [83]. Для регенерации кожи это особенно важно, так как материал должен не только закрывать дефект, но и создавать условия для миграции кератиноцитов, активности фибробластов и формирования новой ткани [84].

В то же время природные полимеры имеют ряд ограничений. Большинство из них не обладает выраженной собственной электропроводностью, а во влажной среде может набухать, частично растворяться, быстро деградировать или терять механическую прочность [85]. Поэтому их использование в системах электростимуляции требует дополнительной модификации: химической сшивки, введения электропроводящих наполнителей, формирования композиционных структур или включения в многослойные конструкции. Таким образом, природные полимеры чаще выступают не как самостоятельные электропроводящие материалы, а как биосовместимые матрицы или контактные слои, которым необходимо взаимодействовать с кожей для передачи электрического сигнала [86].

Одним из наиболее перспективных природных полимеров для регенеративных материалов является хитозан [87]. Он представляет собой производное хитина и относится к катионным полисахаридам. Благодаря наличию аминогрупп хитозан обладает полиэлектролитными свойствами, способен взаимодействовать с ионами и заряженными молекулами, а также формировать плёнки, гидрогели, губчатые матрицы и покрытия [88]. Для раневых и тканеинженерных систем важны его биосовместимость, биорезорбируемость, биоактивность, антибактериальные, гемостатические и ранозаживляющие свойства [89]. Эти особенности делают хитозан удобной основой для материалов, контактирующих с кожей и раневой поверхностью.

С материаловедческой точки зрения хитозан интересен тем, что сочетает способность к плёнообразованию с гидрофильностью и возможностью химической или физической модификации. Его поверхность может поддерживать прикрепление клеток, а катионная природа способствует взаимодействию с белками, компонентами внеклеточного матрикса и клеточными мембранами [90]. Кроме того, хитозан может использоваться как мягкий контактный слой между электропроводящей подложкой и клетками. Такой подход особенно важен для систем электростимуляции, где необходимо отделить клетки от потенциально неблагоприятного прямого контакта с проводящими наполнителями, но при этом сохранить возможность передачи электрического воздействия через водную и ионную среду.

При выборе хитозана для тканевой инженерии учитывают его молекулярную массу, степень деацетилирования и чистоту. Эти параметры влияют на растворимость полимера, вязкость растворов, формирование плёнок, механические свойства и скорость биорезорбции. Устойчивость хитозановых материалов во влажной среде также зависит от способа получения, нейтрализации, степени сшивки и толщины образца [91]. Низкомолекулярные и белковые примеси могут затруднять формирование материала и вызывать нежелательные биологические реакции. Поэтому характеристики исходного хитозана должны воспроизводиться в разных производственных партиях.

Другим ограничением хитозана является низкая электронная проводимость. Без модификации он не может использоваться как проводящая подложка для электростимуляции. Введение углеродных нанотрубок, графена, проводящих полимеров и других наполнителей позволяет повысить электропроводность хитозановой матрицы, а также изменить её механические и поверхностные свойства. Поэтому хитозан рассматривается как основа для композиционных материалов, сочетающих биосовместимость природного полимера с электронной проводимостью введённой фазы [92].

Коллаген является основным белком внеклеточного матрикса соединительных тканей и хорошо распознаётся клетками. Он поддерживает

адгезию, миграцию и пролиферацию клеток, поэтому широко используется для получения гидрогелей, губчатых матриц, плёнок и тканеинженерных каркасов [93]. Для регенерации кожи коллаген особенно важен, поскольку коллагеновые волокна во многом определяют механическую прочность дермы и качество формирующейся ткани. Однако, как самостоятельный материал для электростимуляции коллаген ограничен: он не обладает выраженной электропроводностью, может быстро деградировать и часто требует дополнительной сшивки или введения проводящих компонентов [94].

Желатин, получаемый частичной денатурацией коллагена, также применяется в регенеративных материалах благодаря биосовместимости, гидрофильности и удобству переработки в гидрогели, плёнки и пористые матрицы [95]. Он сохраняет фрагменты, способствующие клеточной адгезии, но во влажной среде может набухать, растворяться и терять форму. Поэтому желатин обычно стабилизируют химической модификацией или сшивкой [96]. Как и коллаген, он практически не обладает собственной электропроводностью, поэтому в электростимулирующих системах используется преимущественно как биосовместимая матрица в составе композитов.

Альгинат представляет собой природный анионный полисахарид, способный образовывать мягкие гидрогели в присутствии двухвалентных катионов. Благодаря высокой гидрофильности и мягким условиям гелеобразования он удобен для создания раневых покрытий, матриц для инкапсуляции клеток и систем доставки биоактивных веществ [97]. Вместе с тем альгинат сам по себе слабо поддерживает клеточную адгезию, поскольку не содержит специфических участков связывания для клеточных рецепторов. Кроме того, его механическая стабильность в физиологической среде ограничена, а электропроводность низкая. Поэтому, для применения в биоэлектронных системах альгинат обычно модифицируют или комбинируют с другими полимерами и проводящими наполнителями [98].

Шелк-фиброин отличается от большинства природных полимеров высокой механической прочностью и структурной стабильностью. Он может перерабатываться в плёнки, волокна, губчатые матрицы и гидрогели. Материал

биосовместим, а скорость его деградации можно регулировать [99]. Электропроводность сухих немодифицированных плёнок шелк-фиброина составляет около $4,4 \times 10^{-13}$ См/м, поэтому материал в таком состоянии проявляет свойства диэлектрика [100]. Для применения в системах электростимуляции шелк-фиброин модифицируют проводящими полимерами, углеродными наноматериалами или металлическими наночастицами.

Сравнение природных полимеров показывает, что их основное преимущество связано с биосовместимостью, гидрофильностью и способностью формировать благоприятный клеточный интерфейс. Однако, эти материалы редко обладают полным набором свойств, необходимых для электростимуляции клеток кожи. Коллаген и желатин хорошо поддерживают клеточную адгезию, но требуют стабилизации. Альгинат удобен для гидрогелевых систем, но нуждается в модификации для улучшения клеточного взаимодействия. Шелк-фиброин обладает высокой прочностью, но также требует функционализации для придания электропроводности. Хитозан занимает особое положение, поскольку сочетает биосовместимость, ранозаживляющие свойства, плёнообразование и полиэлектролитную природу, что делает его особенно перспективным для создания контактных слоёв и композиционных материалов для электростимуляции [101].

1.2.2 Синтетические полимеры для биомедицинских применений

Если природные полимерные матрицы в регенеративных материалах чаще выполняют функцию биосовместимого контактного слоя, то синтетические полимеры в системах электростимуляции обычно решают несколько иную задачу. Они формируют воспроизводимую несущую основу, сохраняющую форму и свойства во влажной среде, и позволяют получать проводящие слои, электроды, гибкие подложки и многослойные конструкции. Поэтому, при выборе синтетической матрицы на первый план выходят не только биосовместимость, но и стабильность механических характеристик, химическая стойкость, барьерные свойства, адгезия между слоями, возможность стерилизации и сохранение геометрии материала при длительном использовании.

К числу наиболее распространённых синтетических полимеров, применяемых в тканеинженерных и биоэлектронных системах, относятся биоразлагаемые полиэфиры, полиуретаны и полиимиды. Биоразлагаемые полиэфиры, такие как полилактид и поликапролактон, удобны для создания временных каркасов и матриц, постепенно замещаемых тканью [102, 103]. Полиуретаны, благодаря эластичности и широким возможностям регулирования состава, применяются в мягких подложках и покрытиях [104]. Полиимиды, в свою очередь, представляют особый интерес для гибких биоэлектронных интерфейсов, поскольку сочетают механическую прочность, термостабильность, химическую стойкость и возможность формирования тонких плёнок [105].

Биоразлагаемые полиэфиры, прежде всего полилактид (ПЛА) и поликапролактон (ПКЛ), широко применяются в регенеративной медицине как временные каркасы, плёнки, волокнистые матрицы и подложки. ПЛА отличается технологичностью и способностью постепенно деградировать в физиологической среде, тогда как ПКЛ характеризуется большей гибкостью и более медленной скоростью разрушения [106]. Эти свойства делают такие полимеры удобными для создания временных тканеинженерных конструкций, однако, в системах электростимуляции их применение ограничено собственной электропроводностью, относительной гидрофобностью и необходимостью дополнительной модификации поверхности. Для придания им электрофункциональных свойств ПЛА и ПКЛ обычно комбинируют с углеродными наноматериалами, проводящими полимерами или металлическими частицами [107, 108].

Полиуретаны применяются в мягких биомедицинских материалах благодаря высокому разрывному удлинению и способности восстанавливать форму после циклической деформации, а так же возможности широкого регулирования свойств за счёт изменения химического состава [104]. В системах электростимуляции они могут использоваться как гибкие подложки и покрытия, способные сохранять контакт с мягкой тканью. Однако, полиуретаны, как и большинство полимерных матриц, не обладают достаточной собственной электропроводностью, поэтому для получения электроактивных материалов их также модифицируют проводящими

наполнителями [109]. При этом ключевой задачей остаётся сохранение баланса между эластичностью, проводимостью, биосовместимостью и стабильностью во влажной среде.

Наиболее значимую роль среди синтетических полимеров для стабильных биоэлектронных интерфейсов играют полиимиды. В отличие от биоразлагаемых полиэфиров, полиимидные материалы обычно рассматриваются не как временные матрицы, участвующие в ремоделировании ткани, а как инженерные основы для долговременных и воспроизводимых устройств. Полиимиды характеризуются высокой термостабильностью, химической стойкостью, механической прочностью и стабильностью размеров [110, 111]. Эти свойства особенно важны для систем, где материал должен выдерживать изготовление, стерилизацию, контакт с жидкой средой и длительное электрическое воздействие без существенного изменения структуры [112].

Полиимиды позволяют получать тонкие и прочные плёнки. При уменьшении толщины плёнка легче изгибается, хотя механические свойства самого полимера не меняются. Это позволяет использовать полиимидные плёнки в микроэлектронике, гибких печатных платах, имплантируемых электродах, сенсорах и других биоэлектронных устройствах [113]. Для задач электростимуляции это особенно важно, поскольку плёночная форма позволяет контролировать толщину, геометрию, площадь контакта и распределение электрического поля.

Полиимиды также обладают высокой химической и термической устойчивостью, что выгодно отличает их от многих природных и биоразлагаемых полимеров. Они способны сохранять структуру при повышенных температурах и в условиях воздействия растворителей, влаги и физиологических сред [110]. Это делает их удобными для многостадийной обработки, нанесения функциональных слоёв, введения наполнителей и стерилизующей обработки. В контексте биомедицинских технологий такая стабильность важна не меньше, чем биосовместимость, поскольку нестабильная матрица может изменять электрические характеристики устройства и снижать воспроизводимость клеточного ответа.

Сами по себе полиимиды, как правило, являются диэлектриками или материалами с низкой электропроводностью. Однако, их структура хорошо подходит для создания электропроводящих композитов [114]. Введение углеродных наполнителей, таких как графен, углеродные нанотрубки или технический углерод, позволяет сформировать в полиимидной матрице проводящие пути. При достижении перколяционного порога электропроводность композита может возрасти на несколько порядков, тогда как полимерная матрица продолжает обеспечивать механическую прочность, термостойкость и стабильность формы [115].

Для биоэлектронных систем особенно важно, что полиимидные композиты могут сочетать электронную проводимость с геометрической стабильностью плёнки [105]. Это отличает их от многих гидрогелевых или биоразлагаемых систем, где электрические свойства могут сильно зависеть от степени набухания, ионного состава среды и времени экспозиции. Полиимидная матрица позволяет создать более стабильный проводящий слой, который способен равномерно распределять электрическое поле и служить основой для подключения внешнего источника сигнала. При этом поверхность такого материала при необходимости может быть дополнительно модифицирована или отделена от клеток биосовместимым промежуточным слоем [113].

Именно поэтому полиимид следует рассматривать не просто как нерезорбируемый материал, а как инженерную матрицу для стабильного биоэлектронного интерфейса. Его задача состоит не в том, чтобы замещаться тканью, а в том, чтобы обеспечивать механически и электрически воспроизводимую платформу для стимуляции. В сочетании с углеродными наполнителями полиимидные плёнки могут выполнять функцию гибких электродов, проводящих подложек и элементов многослойных систем [116].

Таким образом, синтетические полимеры занимают важное место в разработке материалов для электростимуляции клеток кожи. ПЛА и ПКЛ удобны как биоразлагаемые матрицы, полиуретаны – как эластичные и мягкие подложки, однако, для стабильных биоэлектронных интерфейсов особое значение имеют

полиимиды. Их термостабильность, химическая стойкость, механическая прочность, гибкость в виде тонких плёнок и совместимость с углеродными наполнителями позволяют рассматривать полиимидные композиты как перспективную основу для электродов, сенсоров и гибких систем электростимуляции.

1.3 Электропроводящие наполнители в полимерных композиционных материалах

Рассмотренные выше природные и синтетические полимеры позволяют формировать биосовместимые, гибкие и технологичные матрицы для регенеративных и биоэлектронных систем. Однако, большинство таких полимеров в исходном состоянии являются диэлектриками или обладают слишком низкой электропроводностью для эффективной передачи электрического сигнала к клеткам. Поэтому при разработке материалов для электростимуляции ключевую роль играет введение электропроводящих компонентов, способных формировать в полимерной матрице пути переноса заряда.

Электропроводящий наполнитель не только повышает проводимость материала, но и существенно влияет на его структуру, механические свойства, гидрофильность, топографию поверхности и характер взаимодействия с клетками. В зависимости от природы, формы, размера и концентрации частиц наполнитель может формировать отдельные проводящие участки или непрерывную перколяционную сеть. Именно поэтому свойства электропроводящего композита определяются не только химической природой полимера и наполнителя, но и их взаимным распределением, качеством диспергирования и состоянием межфазной границы.

Для биомедицинских задач особенно важно, что увеличение электропроводности не должно достигаться за счёт ухудшения биосовместимости, потери механической гибкости или появления выраженной неоднородности поверхности. Избыточное содержание проводящей фазы может приводить к агрегации частиц, локальному изменению рельефа, снижению прочности, ухудшению клеточной адгезии и риску цитотоксических эффектов. Поэтому

разработка полимерных электропроводящих материалов требует поиска оптимального соотношения между электрическими, механическими, поверхностными и биологическими характеристиками.

1.3.1 Классы проводящих компонентов

Проводящие компоненты, применяемые для электростимуляции клеток, условно делят на три основные категории: биоматериалы на основе углерода, металлы и оксиды металлов, проводящие полимеры (Рисунок 1.2).

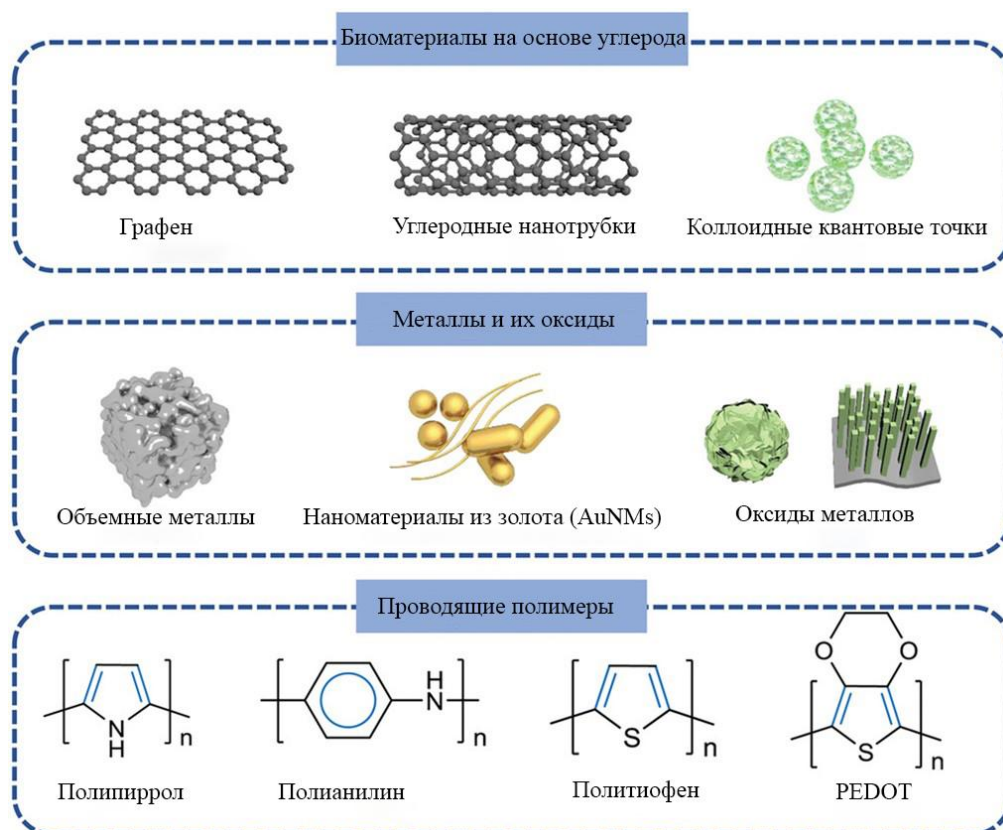


Рисунок 1.2 – Классификация электропроводящих материалов, используемых в тканевой инженерии [117]

Значительный интерес в биомедицинской науке вызывают углеродные биоматериалы, такие как 3D-графит, 2D-графен, 1D-углеродные нанотрубки (УНТ), 0D-углеродные точки (С-точки), фуллерены и наноалмазы [118]. Несмотря на то, что все эти материалы состоят преимущественно из углерода, их аллотропные формы, размеры, механические свойства и поверхностная химия придают им разнообразные характеристики [119].

Материалы на основе графена и УНТ наиболее широко применяются в тканевой инженерии благодаря сочетанию высокой электропроводности, химической стабильности, развитой поверхности и уникальных механических свойств. Графеновые структуры привлекательны высокой проводимостью и химической стойкостью [120]. Благодаря двумерной геометрии они способны формировать проводящие пути при относительно малых концентрациях, обеспечивая низкий порог формирования сети [121]. Ключевые ограничения связаны со склонностью к агрегации и требованиями к чистоте и воспроизводимости дисперсии, поэтому графен часто используют в тонких проводящих слоях и на стабильных (как правило, небioresорбируемых) подложках, где важна долговременная стабильность электрических параметров. Одностенные углеродные нанотрубки обладают высоким аспектным отношением. Благодаря этому проводящая сеть формируется при небольшом содержании наполнителя и сопровождается резким увеличением электропроводности композита [122]. Нанотрубки также изменяют микро- и нанорельеф поверхности материала [123]. При этом ОСУНТ склонны к агрегации, которая приводит к неоднородности структуры и свойств композита. При использовании материала в водной или биологической среде необходимо учитывать возможность высвобождения нанотрубок из полимерной матрицы при её набухании или разрушении. Кроме того, ОСУНТ могут значительно повышать вязкость полимерных растворов и расплавов. Это затрудняет равномерное распределение наполнителя, удаление пузырьков и получение однородных плёнок и гидрогелей.

Металлические материалы (титан, магний, нержавеющая сталь) традиционно используются как имплантаты для восстановления костной ткани благодаря их высокой прочности, усталостной стойкости и электропроводности [124]. В последние годы разработаны пористые металлические каркасы, обладающие повышенной электропроводностью и способные к загрузке терапевтических агентов, а также к стимуляции васкуляризации [125].

Особое внимание уделяется наноструктурам на основе золота (AuNM) [126], включая наночастицы, наностержни и нанопроволоки, которые сочетают высокую

биосовместимость, химическую стабильность и легкость функционализации. Введение Au-наночастиц в биополимерные матрицы улучшает электропроводность композитов, что способствует повышению эффективности тканевой инженерии при оптимальной концентрации наполнителя [127]. Благодаря большой удельной поверхности и возможности модификации с помощью золото–тиоловой химии такие наноструктуры используются как платформы для доставки лекарств и факторов роста. Помимо золота, для аналогичных целей применяются другие металлы и оксиды металлов (Ag, Zn, Ti, B, Sr, Mg, Cu, Pt), особенно в материалах для регенерации костной ткани [128].

В отличие от углеродных и металлических систем, проводящие полимеры объединяют электрическую активность с гибкостью и малой жёсткостью, характерной для органических матриц. Они обладают значительными преимуществами в биомедицинских применениях, обеспечивая как передачу электрического сигнала, так и адаптацию к мягким биотканям. Электропроводность таких полимеров в окисленном и восстановленном состояниях лежит в диапазоне $10^{-7} - 10^3$ См/м [44], что обусловлено наличием сопряжённых двойных связей в основной цепи [129]. К числу наиболее часто используемых в биомедицине проводящих полимеров относят полипиррол (ППи), полианилин (ПАНИ), политиофен и его производные, включая поли(3,4-этилендиокситиофен) (ПЭДОТ) [130]. Размер, природа и распределение заряда допантов (противоионов) оказывают существенное влияние на электропроводность и функциональные свойства этих полимеров [131].

Рассмотренные группы электропроводящих компонентов различаются не только уровнем проводимости, но и характером взаимодействия с полимерной матрицей и биологической средой. Металлические наноструктуры обладают относительно высокой электропроводностью и удобны для функционализации, однако, могут повышать жёсткость системы и вызывать нежелательные реакции при длительном контакте с физиологической средой. Проводящие полимеры лучше согласуются с мягкими тканями, но их свойства зависят от допирования и могут изменяться во влажной среде.

В связи с этим в настоящей работе были выбраны углеродные наполнители – одностенные углеродные нанотрубки и графен. Выбор конкретных сочетаний определялся свойствами полимерных матриц. ОСУНТ благодаря высокому аспектному отношению способны формировать проводящую сеть при небольшом содержании. Это позволяет ограничить изменение свойств хитозановой матрицы. Нанотрубки также могут изменять микро- и нанорельеф её поверхности. Графен, напротив, целесообразен для модификации более стабильной полиимидной матрицы, где он выполняет роль электронно-проводящего компонента. Он имеет пластинчатую структуру и образует многочисленные контакты между частицами в объёме полиимида. Его химическая и термическая стабильность соответствует свойствам полиимидной матрицы.

1.3.2 Перколяция и механизмы переноса заряда в полимерных композитах

Для дисперсных электропроводящих композитов появление выраженной электронной проводимости связано с формированием непрерывной сети контактов внутри полимерной матрицы. Этот переход описывают с помощью перколяционного порога. При достижении критического содержания проводящей фазы отдельные частицы и их агрегаты образуют связанные токопроводящие пути, а электропроводность материала возрастает на несколько порядков [132]. При переменном электрическом воздействии также учитывают импеданс материала, который зависит от частоты сигнала и определяет величину тока при заданном напряжении.

При этом перколяционный переход не является строго универсальной величиной для одного и того же наполнителя. Он зависит от формы частиц, их аспектного отношения, степени диспергирования, ориентации в матрице и характера межчастичных контактов. Для углеродных нанотрубок существенную роль играет их высокая длина при малом диаметре, благодаря чему проводящая сеть может формироваться уже при сравнительно низких концентрациях [133]. Для графеновых частиц важны площадь пластин, степень их расслоения и возможность соприкосновения или сближения соседних листов [134]. Поэтому одинаковое

массовое содержание наполнителя в разных полимерных матрицах не всегда приводит к одинаковой проводимости: решающим становится не только количество проводящей фазы, но и то, как именно она организована в объёме материала.

Ниже перколяционного порога композит обычно сохраняет свойства диэлектрика или слабопроводящей системы, однако, перенос заряда полностью не исключается. В этом случае возможны локальные механизмы проводимости, такие как туннелирование электронов между близко расположенными частицами, прыжковый перенос по дефектным участкам, а также движение зарядов через тонкие полимерные прослойки между элементами наполнителя [135]. Такие механизмы особенно заметны в системах, где проводящие частицы находятся на малом расстоянии друг от друга, но ещё не образуют непрерывной сетки. После превышения порога основным становится перенос по связанным проводящим кластерам, и материал начинает проявлять свойства электронного проводника (Рисунок 1.3).

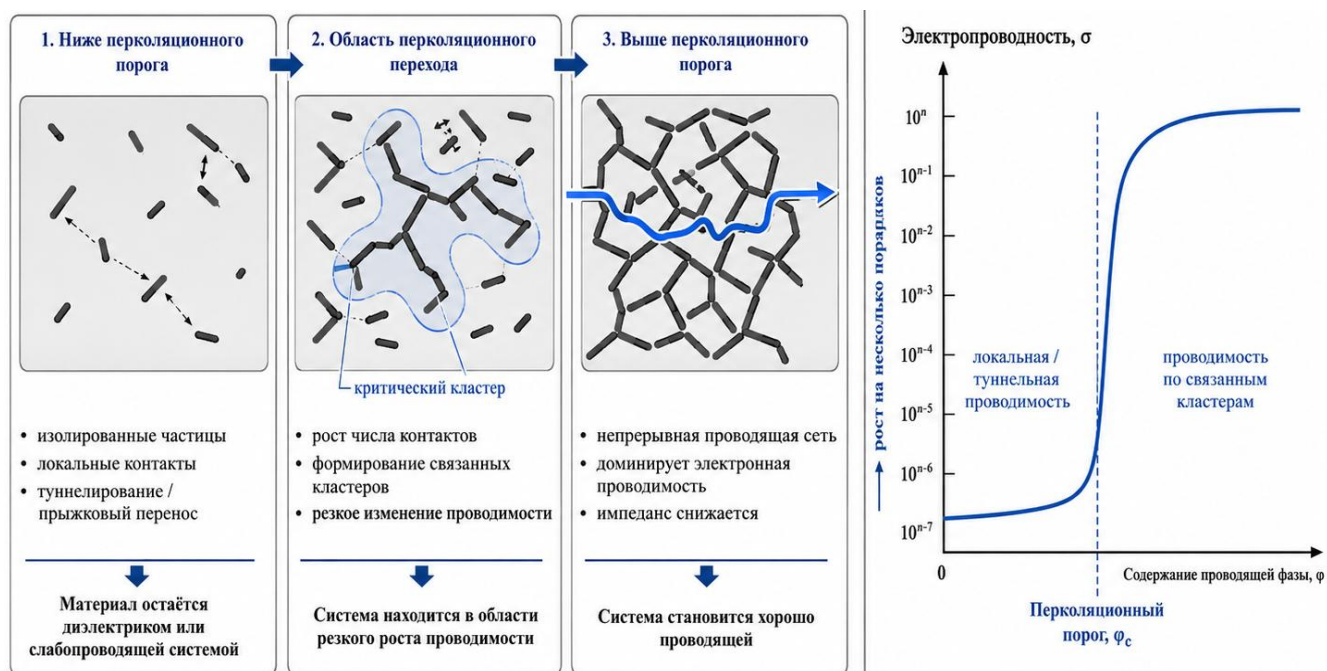


Рисунок 1.3 – Перколяционный переход в электропроводящем полимерном композите

Практически это означает, что воспроизводимость электрических характеристик полимерного композита определяется не только природой и

концентрацией наполнителя, но и устойчивостью сформированной проводящей сети. При гидратации, набухании, изгибе или растяжении матрицы расстояние между частицами изменяется. Одни контакты могут нарушаться, а другие возникают за счёт сближения элементов наполнителя. Поэтому электропроводность и импеданс материала могут меняться даже при неизменном химическом составе [133]. Для материалов, контактирующих с клеточной культурой или раневой средой, этот фактор особенно важен из-за одновременного воздействия жидкости, солей, белков и механических деформаций. Универсального значения импеданса, оптимального для роста клеток, не установлено. При прочих равных предпочтителен более низкий и стабильный импеданс, поскольку он обеспечивает передачу заданного тока при меньшем приложенном напряжении.

В физиологической среде к электронной проводимости композита добавляется ионная составляющая. Ионы электролита проникают в гидрофильные области матрицы, концентрируются на границах раздела фаз и участвуют в формировании двойного электрического слоя. Поэтому электрический ответ влажного материала может существенно отличаться от поведения сухого образца. Даже если в сухом состоянии композит демонстрирует преимущественно электронный перенос, в растворе его импеданс определяется уже совместным вкладом проводящей сетки, полимерной матрицы, электролита и межфазных областей. Дополнительное влияние оказывает адсорбция белков на поверхности, поскольку первичный белковый слой меняет заряд, смачиваемость и характер контакта клеток с материалом [136].

Поэтому при проектировании электропроводящих полимерных композитов для биомедицинских технологий целевым параметром не может быть только максимально высокая проводимость. Более важной задачей является формирование устойчивого и воспроизводимого пути переноса заряда, который сохраняется во влажной среде и при механических воздействиях. Такой материал должен обладать контролируемым импедансом на границе с биологической средой, не вызывать чрезмерного локального тока и одновременно сохранять механическую целостность, гидрофильность и биосовместимость [137]. Именно сочетание этих

характеристик определяет пригодность композита для электрической стимуляции клеток и создания биоэлектродов для регенеративных технологий.

1.4 Формы и принципы разработки электропроводящих биоматериалов

1.4.1 Основные формы электропроводящих материалов

Электропроводящие биоматериалы для регенеративной медицины могут быть реализованы в различных морфологических формах – гидрогели, трёхмерные каркасы, плёнки и наночастицы. Архитектура материала определяет не только его электрические и механические свойства, но и характер взаимодействия с клетками, проницаемость для питательных веществ и сигнальных молекул, а также биodeградацию и интеграцию с тканями.

Гидрогели имитируют естественную внеклеточную матрицу, обладают высоким влагосодержанием и мягкостью, что делает их подходящими для культивирования клеток мягких тканей (нервной, мышечной, кожной). Добавление проводящих компонентов (ППи, ПЭДОТ, графен, УНТ) обеспечивает возможность электрической стимуляции клеток в объёме гидрогеля. Однако, гидрогели характеризуются сравнительно низкой электропроводностью, слабой механической стабильностью и сложностью в обеспечении равномерного распределения проводящих фаз.

Трёхмерные каркасы обеспечивают пористую структуру, пригодную для клеточной инфильтрации, ангиогенеза и роста тканей. Такие каркасы часто формируют из биополимеров (хитозан, коллаген, ПЛА, ПКЛ) с добавлением проводящих наполнителей (графен, УНТ, ПЭДОТ, ППи) или металлических наночастиц (Au, Ag). Они эффективны для инженерии кости, миокарда и нервной ткани, но требуют сложных методов изготовления и не всегда обеспечивают равномерную электропроводность в объёме, особенно при больших размерах пор.

Электроформование (электроспиннинг) позволяет получать нано- и микроволокнистые матрицы, сочетающие высокую пористость и развитую поверхность, что способствует адгезии и пролиферации клеток. Волокна из композитов ППи/ПЛА, ПЭДОТ/ПКЛ или графен-хитозана демонстрируют направленный рост нейронов и фибробластов под действием электрического

поля [138]. Основные ограничения связаны с низкой толщиной отдельных волокон и трудностью достижения стабильного контакта электродов с волокнистой поверхностью.

Плёночные материалы занимают особое место среди проводящих систем, так как обеспечивают равномерное распределение электрического поля, контролируемую толщину и стабильный контакт с электродами, что делает их особенно подходящими для *in vitro* электростимуляции клеток. Гибкие плёнки из полиимида, хитозана, полиуретана и их композитов с углеродными наполнителями, ППи, ПЭДОТ или наночастицами металлов обеспечивают оптимальное сочетание электропроводности, биосовместимости и механической устойчивости. В отличие от гидрогелей и 3D-каркасов, плёнки позволяют точно контролировать плотность тока, потенциал и распределение поля на поверхности, что обеспечивает высокую воспроизводимость экспериментов и возможность количественного анализа клеточного ответа.

Наночастицы и наностержни применяются преимущественно как вспомогательные элементы – в качестве допантов или наполнителей для улучшения электропроводности, фото- и термоотклика композитов. Например, наночастицы золота или оксида графена придают подложкам дополнительную электрическую активность и улучшают адгезию клеток за счёт увеличения локальной шероховатости [139].

Можно заключить, что архитектура электропроводящих биоматериалов определяется не только требованиями к механическим и электрическим характеристикам, но и особенностями предполагаемого применения. Для задач моделирования клеточных ответов на электростимуляцию *in vitro* наиболее перспективными считаются тонкие гибкие плёнки, обеспечивающие стабильный электрический контакт, контролируемые параметры поля и воспроизводимость биологических эффектов.

1.4.2 Рациональный дизайн электропроводящих биоматериалов

Современные исследования электропроводящих биоматериалов направлены на достижение оптимального баланса между электрической активностью и

биосовместимостью. Этот компромисс является ключевым вызовом при создании материалов для регенерации возбудимых тканей – нервной, мышечной, сердечной, кожной и др. Повышение проводимости обычно достигается введением углеродных наноструктур (графен, нанотрубки), металлических наночастиц или конъюгированных полимеров, однако, их избыточное содержание делает поверхность материала избыточно гидрофобной, а также вызывает агрегацию и потенциальную цитотоксичность, что ухудшает адгезию и пролиферацию клеток. В то же время высоко биосовместимые полимеры – такие как хитозан, полиимиды и полиэфиры – обладают низкой электропроводностью, что ограничивает их применение в биоэлектронных системах.

В ответ на эту проблему в мировой науке сформировался тренд рационального дизайна, ориентированный на управляемое сочетание разнонаправленных свойств за счёт структурного и функционального проектирования композиции на нескольких уровнях. Такой подход позволяет формировать иерархически организованные материалы, где проводящие пути образуются при минимальном содержании электропроводящей фазы без потери биосовместимости и механической гибкости матрицы.

Концепция рационального дизайна реализуется через:

- мультикомпонентные композиции (гибриды природных и синтетических полимеров с углеродными наноструктурами, металлами или проводящими полимерами);
- контроль морфологии и распределения проводящих доменов на микро- и наноуровне;
- анизотропную архитектуру, обеспечивающую направленный перенос заряда в соответствии с физиологическими токами тканей;
- регулирование гидрофильности и модуля упругости, сопоставимых с внеклеточным матриксом.

В настоящее время научные подходы смещаются от разработки просто «проводящих» материалов к созданию электроактивных и электроотзывчивых биосистем, которые не только обеспечивают транспорт заряда, но и активно модулируют клеточное поведение.

Анализ современных подходов к созданию электропроводящих биоматериалов показывает, что наибольший потенциал для решения задачи совмещения биосовместимости и электрической активности имеют композиционные системы. Именно композиты, объединяющие функциональные свойства органических и неорганических компонентов, позволяют направленно модифицировать структуру и свойства материала в соответствии с требованиями биоэлектронных интерфейсов.

Несмотря на разнообразие проводящих биоматериалов и методов их обработки, формирование биосовместимого электропроводящего микроокружения для регенерации тканей по-прежнему остаётся актуальной научной задачей. Неорганические проводящие добавки, например, УНТ и AuNM, демонстрируют отличную проводимость даже при низких концентрациях, но их плохая дисперсия в полимерной матрице снижает однородность композитных биоматериалов и ограничивает возможность их массового производства. Кроме того, из-за несоответствия механических свойств между неорганическими добавками и полимерной матрицей деформации композитных биоматериалов, вызванные натяжением и изгибом, могут влиять на их проводимость.

Как правило, рационально спроектированные проводящие биоматериалы обладают хорошей биосовместимостью [140]. Однако при разработке таких материалов необходимо учитывать их долгосрочную биобезопасность и биораспределение, то есть возможное распределение, накопление и выведение компонентов материала из организма. Сообщается, что токсичность материалов на основе углерода зависит от их размера, доз, концентраций и содержания кислорода на поверхности [141]. Возможные механизмы их цитотоксичности включают индукцию агрегации белков через аномально сильные взаимодействия с белками и разрушение структуры клеточных мембран [142]. В экспериментах на животных

было показано, что УНТ могут вызывать воспаление, опосредованное активными формами кислорода, эпителиоидные гранулемы и фиброз, что приводит к нарушению работы легких [143]. Материалы на основе углерода, особенно углеродные точки, могут накапливаться в различных органах, включая печень, селезенку, желудок, почки, мозг и сердце [144], вызывая нейротоксичность, дефицит поведенческих реакций нейронов, повреждения, изменения в сердце и дофаминергической системе, а также влиять на экспрессию генов нейронов [145]. При этом некоторые исследования показывают, что материалы на основе углерода могут избирательно распределяться в организме и быстро выводиться через почки [146].

В конструкции композитных биоэлектродов важную роль играет взаимодействие между поверхностью электропроводящего материала и биологической средой, поскольку именно оно определяет эффективность работы системы. Первичный слой адсорбированных белков обеспечивает адгезию клеток и формирует биосовместимость композита. На характер этого слоя влияют морфология и шероховатость поверхности, её заряд, смачиваемость и сорбционные свойства полимерной матрицы. Оптимальное сочетание этих параметров обеспечивает благоприятные условия для прикрепления и пролиферации клеток, что делает поиск и разработку полимерных систем с управляемыми поверхностными свойствами одним из ключевых направлений в создании современных биоэлектронных материалов.

Разработанные в данной работе гибкие композиты на основе полиимида с графеном и хитозана с углеродными нанотрубками отвечают этим тенденциям. Они демонстрируют согласование электрических, механических и биологических свойств и реализуют принципы рационального дизайна через контролируемое формирование проводящих путей и оптимизацию поверхности для клеточной адгезии, что обеспечивает эффективную стимуляцию клеток без нарушения их жизнеспособности. Такой подход решает ключевую задачу современного биоматериаловедения – создание биосовместимых электропроводящих платформ для регенеративной медицины и биоэлектроники нового поколения.

1.5 Методы электрической стимуляции

Эффективность экзогенной электрической стимуляции во многом определяется правильно выбранными параметрами воздействия – формой сигнала, направленностью тока, частотой, амплитудой и продолжительностью процедуры. Оптимальные режимы позволяют воспроизводить природные биоэлектрические потенциалы, минимизировать побочные эффекты и направленно регулировать процессы регенерации тканей.

В современной электротерапии применяются различные формы сигналов – постоянные, переменные и импульсные. Постоянный ток является одним из наиболее изученных типов воздействия. Он обеспечивает точный контроль параметров – напряжения, силы тока и времени стимуляции – и может создаваться с помощью простых источников питания [147]. Электрическое поле постоянного тока (30-250 мВ/мм) стимулирует направленную миграцию клеток, в том числе нейральных и остеогенных прогениторов, в сторону катода [148]. При этом наблюдается повышение внутриклеточной концентрации кальция и перестройка цитоскелета, способствующие усилению миграции [149]. Однако, при длительном применении возможно накопление заряда у электродов и сдвиг pH среды, что ограничивает использование постоянного тока при длительных процедурах.

Переменный ток позволяет варьировать параметры воздействия – форму волны (квадратная, синусоидальная, треугольная, импульсная), частоту и длительность импульса (Рисунок 1.4). Наиболее безопасным и физиологичным считается биполярный сигнал, при котором обеспечивается баланс заряда и исключается накопление ионов [150].

Низкочастотная стимуляция (до 1 Гц) применяется для регуляции нейрональной активности, среднечастотная (1 – 10 Гц) – для стимуляции кардиомиоцитов и ангиогенеза, а более высокочастотная – для ускорения остеогенной дифференцировки [151, 152]. При этом необходимо строго контролировать силу тока: превышение пороговых значений (более 2 мА) может вызвать гибель клеток и повреждение тканей [153, 154].

По направленности движения заряда различают однонаправленный и двунаправленный ток. Однонаправленный ток включает постоянный ток (DC) и однонаправленный импульсный ток. Его особенностью является движение заряженных частиц в одном направлении и наличие постоянной полярности. Такое воздействие позволяет имитировать эндогенное электрическое поле раны: анод размещают на неповреждённой коже, катод – в центре раневого дефекта. При этом клетки мигрируют к катоду, что способствует ускоренному заживлению. Однако, при длительной стимуляции постоянным током возможно локальное повышение температуры, изменение pH и развитие электролитических реакций, способных вызвать повреждение тканей [155].

Двунаправленный ток характеризуется периодической сменой полярности. Электроды при этом размещают на интактной коже по обе стороны от раны, а заряженные частицы в подлежащих тканях попеременно изменяют направление движения. Благодаря этому удаётся избежать теплового эффекта и электролиза среды [156]. Применение двунаправленного тока снижает риск раздражения тканей и обеспечивает более равномерное распределение электрического поля, что делает его предпочтительным для клинического применения [157].

Несмотря на различия в конфигурации поля, оба типа тока (однонаправленный и двунаправленный) оказывают сходное стимулирующее действие на клеточную миграцию, пролиферацию и синтез внеклеточного матрикса.

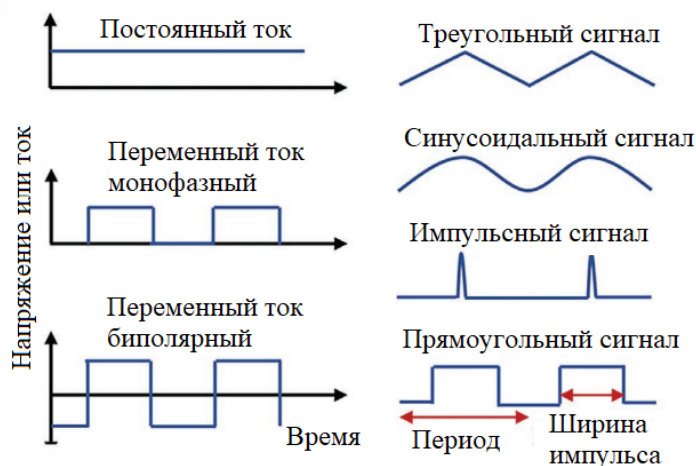


Рисунок 1.4 – Формы электростимуляции для регенерации тканей

Электростимуляция тканей может осуществляться различными способами в зависимости от типа контакта и физического принципа передачи сигнала. Прямая стимуляция предполагает непосредственное соприкосновение электродов с тканью или клеточной культурой. Метод прост и обеспечивает точное управление параметрами, однако, сопряжён с риском электролиза среды, локального перегрева и изменения ионного баланса.

Капацитивная стимуляция реализуется через диэлектрическую прослойку, которая изолирует электрод от клеток. Электрическое поле передаётся за счёт ёмкостной связи, исключая прямой контакт и химические реакции на границе раздела. Этот способ обеспечивает более мягкое, физиологичное воздействие и снижает риск повреждения клеток [44].

Пьезоэлектрическая стимуляция основана на способности материалов (например, поливинилиденфторида, оксида цинка или гидроксиапатита) генерировать электрический потенциал при механической деформации. Такие материалы способны вызывать локальную стимуляцию клеток *in situ*, что открывает возможности для создания самогенерирующих повязок и имплантатов [158].

Анализ экспериментальных и клинических данных показывает, что для достижения терапевтического эффекта необходимо учитывать комплекс параметров электрического сигнала и характеристик ткани. Наиболее эффективной для регенерации кожи считается биполярная импульсная стимуляция напряжённостью поля до 300 мВ/мм, передаваемая капацитивным способом через изолирующую мембрану. Такой режим обеспечивает мягкое воздействие, предотвращает электролитические побочные реакции и безопасен при длительном применении. Подобные условия максимально приближены к эндогенным биоэлектрическим полям, возникающим в процессе заживления ран, и обеспечивают направленную миграцию клеток, стимуляцию ангиогенеза и ускоренное восстановление кожных тканей без повреждения клеточных структур.

1.6 Перспективные подходы к электростимуляции заживления кожи

Несмотря на значительный прогресс в разработке электропроводящих материалов для регенеративной медицины, на сегодняшний день сохраняется ряд ограничений, препятствующих их широкому применению. Большинство существующих систем демонстрируют высокую электропроводность и биоактивность лишь в краткосрочных испытаниях *in vitro*, тогда как их долговременная стабильность и безопасность *in vivo* остаются недостаточно изученными.

Проводящие полимеры (ППи, ПАНИ, ПЭДОТ) обладают выраженной электрической активностью и возможностью тонкой настройки свойств за счёт допирования, однако, характеризуются низкой механической прочностью и ограниченной химической устойчивостью в физиологических условиях. Со временем происходит деградация допантов и снижение проводимости, что приводит к нестабильности электрического сигнала при длительной эксплуатации [159].

Углеродные наноструктуры (графен, углеродные нанотрубки, углеродные нановолокна) обеспечивают высокую электропроводность и развитую поверхность [160], однако, их равномерное распределение в полимерной матрице остаётся технологически сложным. Агрегация наночастиц и несоответствие механических свойств между фазами создают неоднородность электрического поля и могут вызывать цитотоксические эффекты. Биосовместимость углеродных материалов существенно зависит от размеров, формы и функционализации частиц [143], что затрудняет стандартизацию и воспроизводимость биологических результатов.

Металлические наноструктуры (Ag, Au, Ti, Zn, Cu и др.) применяются для повышения электропроводности и антибактериальных свойств композитов, однако, при длительном контакте с биосредой способны к ионному выщелачиванию и индукции оксидативного стресса, что ограничивает их использование при долговременной стимуляции тканей [161].

Дополнительной проблемой остаётся обеспечение механической гибкости и стабильности проводящих систем, особенно в условиях циклических деформаций,

характерных для кожных покровов. Многие материалы теряют целостность или контакт с электродами при многократных изгибах и растяжении.

Кроме того, отсутствует унифицированный подход к параметрам электрической стимуляции. Исследования различаются по форме сигнала (постоянный, переменный, импульсный ток), амплитуде, частоте и длительности воздействия, что затрудняет сопоставление результатов [162]. Большинство работ ограничено *in vitro* экспериментами, тогда как *in vivo* подтверждения эффективности таких систем немногочисленны [163].

Особый интерес представляет конденсаторная схема электростимуляции, при которой электрическое поле передаётся через биополимерную прослойку без прямого контакта электродов с клетками. Такой подход позволяет избежать электролитических реакций и локального повреждения, обеспечивая физиологичный уровень воздействия [164]. Концепция соответствует современным тенденциям в развитии мягких биоэлектронных систем и формирует основу научной ниши настоящего исследования, направленного на создание биосовместимых электропроводящих композитов для эффективной и безопасной стимуляции регенерации кожных тканей.

Большинство известных работ по электрической стимуляции клеток кожи реализуется с использованием подложек, содержащих электропроводящие компоненты – углеродные нанотрубки, графен, металлы, проводящие полимеры. Такой подход обеспечивает прямой контакт клеток с токопроводящей поверхностью, однако, сопряжён с рядом ограничений:

- высокая концентрация проводящих наполнителей может снижать гидрофильность поверхности и ухудшать адгезию клеток;
- прямой контакт с наночастицами способен вызывать стрессовые реакции, нарушение целостности мембран и активацию апоптоза;
- в процессе длительного культивирования формируется внеклеточный матрикс, изменяющий качество электрического контакта и снижающий эффективность стимуляции.

Для частичного решения этих проблем применяются методы модификации поверхности – плазменная обработка, нанесение белковых покрытий (коллаген, фибронектин), функционализация кислородсодержащими группами. Однако они лишь частично улучшают биосовместимость и не устраняют риски цитотоксичности.

В этой связи актуален подход с использованием биополимерных промежуточных слоёв, которые, с одной стороны, обеспечивают благоприятную поверхность для прикрепления и роста клеток, а с другой – сохраняют возможность передачи электрического импульса от композита к клеточному слою. Среди различных биополимеров (коллаген, альгинат, желатин) особое внимание привлекает хитозан, обладающий биосовместимостью, биоактивностью и антимикробным действием, а также способностью формировать тонкие равномерные плёнки.

В настоящем исследовании реализован двухэтапный подход:

1. На первом этапе фибробласты и кератиноциты культивировали непосредственно на поверхности электропроводящего материала на основе хитозана и ОСУНТ или полиимида с наночастицами графена, и вдобавок подвергали электрической стимуляции. Это позволило оценить влияние прямого контакта проводящей подложки на клеточную активность.
2. На втором этапе методика была модифицирована: клетки высаживали на хитозановую плёнку, плотно прилегавшую к проводящему материалу, в качестве которого использовали полиимидную матрицу с графеном. При подаче напряжения, стимуляцию осуществляли через этот промежуточный слой, что позволило минимизировать прямое воздействие наночастиц на клетки при сохранении эффективности передачи электрического сигнала.

С учётом выявленных ограничений и нерешённых вопросов в области разработки электропроводящих композитов для регенерации тканей, в настоящей работе поставлена задача создания биосовместимых гибких материалов,

способных обеспечивать стабильное и контролируемое электрическое воздействие на клетки кожи. Данная работа, в отличие от большинства известных решений, рассматривает гибридную схему электростимуляции с использованием биосовместимого хитозанового промежуточного слоя. Это позволяет объединить преимущества прямого и емкостного воздействия, а также формирует научную нишу проведенных исследований, направленных на создание гибких композитных материалов для биомедицинских технологий регенерации кожи.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

2.1.1 Биорезорбируемые материалы

В качестве биосовместимой электропроводящей матрицы применяли композит хитозана с одностенными углеродными нанотрубками.

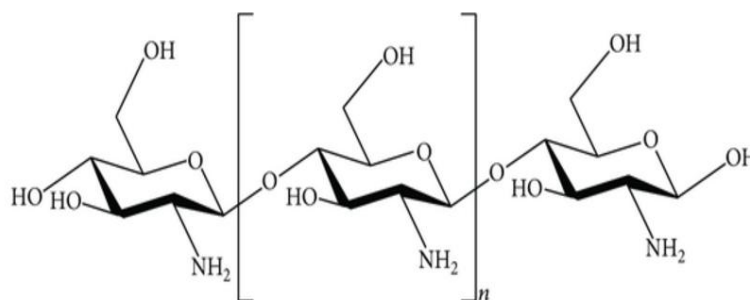


Рисунок 2.1 – Химическая структура молекулы хитозана

Для получения композиционных плёнок в работе использовали хитозан производства Biolog Herre GmbH (Ландсберг, Германия) с молекулярной массой $M_m = (1.64 - 2.1) \times 10^5$, и степенью деацетилирования $DD = 92 \%$.

Для растворения хитозана в водную систему вводили ледяную уксусную кислоту (ЛенРеактив, Россия) до конечной концентрации 2 мас. %.

В качестве наполнителя использовали водную дисперсию одностенных углеродных нанотрубок с концентрацией 2,5 мас. % производства ООО «Углерод-ЧГ» (Черноголовка, Россия). Средний диаметр ОСУНТ составлял $1,4 \pm 0,3$ нм, длина 1 – 5 мкм.

2.1.2 Нерезорбируемые материалы

Для синтеза полиимида Р-ОДФО использовали диангидрид Р (1,3-бис(3',4'-дикарбоксифенокси)бензол) с температурой плавления около 164°C производства ООО «ТехХимПром» (Ярославль, Россия) и диамин ОДФО (4,4'-бис(4''-аминофенокси)бифенил) с температурой плавления $198 - 199^\circ\text{C}$ производства VWR International. Для ограничения роста полимерной цепи применяли фталевый ангидрид с температурой плавления $131 - 134^\circ\text{C}$. Фталевый ангидрид, триэтиламин и бензол были получены от Sigma-Aldrich Co. LLC. Химическая

структура полиимида Р-ОДФО представлена на рисунке 2.2. N,N-диметилацетамид (ДМАА, 99 %, ООО «Экотек», Россия) использовали в качестве растворителя при синтезе полиамидокислоты.

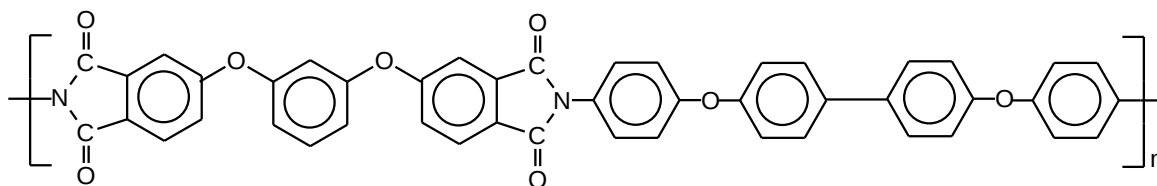


Рисунок 2.2 – Химическая формула полиимида Р-ОДФО

Полученный Р-ОДФО представлял собой частично кристаллический термопластичный полиимид с плотностью 1,27 г/см³, температурой стеклования около 205 °С и температурой плавления около 318 °С.

В качестве наполнителя использовали графеновые пластины производства ООО НПО «Графеновые материалы» (Санкт-Петербург, Россия). Их линейный размер в плоскости составлял 30 – 50 мкм, толщина 0,34 – 4 нм.

2.2 Получение электропроводящих композитных материалов и образцов на их основе

2.2.1 Получение композитных материалов на основе хитозана и ОСУНТ

При изготовлении композитных плёнок первоначально приготавливали водные растворы хитозана и ОСУНТ. На первом этапе водная дисперсия, содержащая ОСУНТ, была получена в течение 15 мин для того, чтобы добиться равномерного распределения частиц по всему объему. Для этого использовался ультразвуковой генератор IL10-0.63 (“Ultrasonic equipment Inlab”, Россия) работающий при частоте 22 кГц и мощности 630В. Затем в водную дисперсию, содержащую ОСУНТ, добавляли хитозан в объеме, необходимом для получения концентрации 4 мас.% хитозана в растворе. По отношению к хитозану содержание ОСУНТ составляло 0, 0,1, 0,5, 1 и 3 мас.%.

Порошок хитозана вводили в полученную водную суспензию ОСУНТ при перемешивании на верхнеприводной лабораторной мешалке со скоростью 1100 об/мин в течение 35 мин до набухания и частичного растворения хитозана. Затем в

систему вводили уксусную кислоту до концентрации 2 мас.% для полного растворения хитозана. Жидкую смесь, состоящую из раствора хитозана, уксусной кислоты и ОСУНТ, перемешивали в течение 3 часов со скоростью 1500 об/мин. После этого производили фильтрацию раствора хитозана с ОСУНТ и обезвоздушивание в сушильном вакуумном шкафу Ulab UT-4630V в течение 24 час при давлении 10 кПа. Готовые растворы помещали на сутки в холодильник при температуре 4 °С.

При формировании плёночных материалов полученный раствор отливали путем экструзии раствора через щелевую фильеру на стеклянную обезжиренную подложку. За отливкой следовала выдержка в сушильном шкафу при температуре 50 °С в течение 1 ч. Далее плёнки на стеклянной подложке деаэрировали в вакуумной камере Ulab UT-4630V в течение 24 ч при давлении 10 кПа, а затем сушили на воздухе при комнатной температуре в течение 1 суток для формирования структуры плёнки. Из-за содержания уксусной кислоты полученный материал был водорастворим, неэластичен и непригоден для клеточных технологий.

Для перевода хитозановых плёнок из солевой в водонерастворимую основную форму проводили нейтрализацию с последующим удалением остатков уксусной кислоты и продуктов её нейтрализации. Для этого плёнки после снятия с подложки обрабатывали в спирто-щелочной смеси 10 %-ного водного раствора NaOH и C₂H₅OH в пропорции 30:70 в течение 15 мин. После этого плёнки отмывали дистиллированной водой в течение 15 мин, трижды меняя воду, высушивали с фиксацией для удержания формы, сушили и хранили на воздухе при комнатной температуре. Толщину измеряли цифровым микрометром (МЕГЕОН 80800, Россия) с шагом измерения 1 мкм на нескольких участках каждой плёнки. Средняя толщина составляла 40 ± 5 мкм. Полученные композиционные плёнки были однородными и равномерно окрашенными в чёрный цвет.

2.2.2 Получение композитных материалов на основе полиимида и графена

Синтез частично кристаллического полиимида Р-ОДФО на основе резорцинового диангидрида Р и диамина ОДФО осуществляли методом

термической имидизации по методике, описанной в работе [165]. Схема синтеза представлена на рисунке 2.3.

На первом этапе в диметилацетамиде (ДМАА) при температуре 15 °С проводили поликонденсацию диангида P и диамина ОДФО с образованием полиамидокислоты (ПАК). Фталевый ангидрид использовали в качестве ограничителя роста цепи. Мольное соотношение диамина ОДФО, диангида P и фталевого ангидрида составляло 1:0,95:0,1. Полученная полиамидокислота имела средневесовую молекулярную массу $M_w \sim 30\,000$ г/моль.

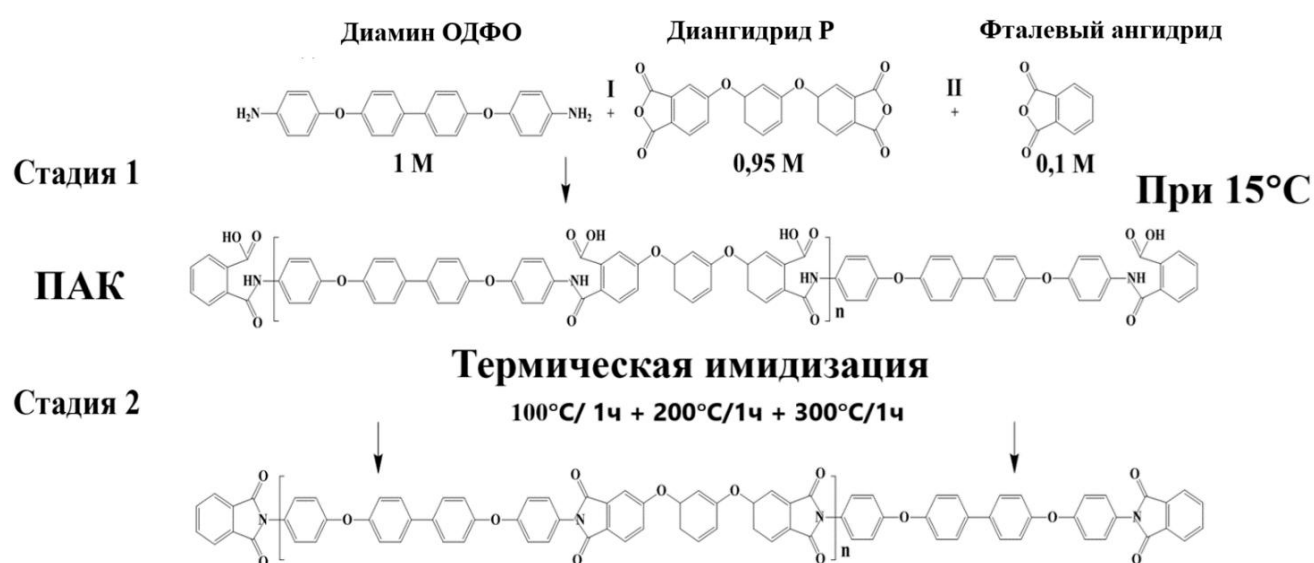


Рисунок 2.3 – Схема синтеза частично кристаллического полиимида Р-ОДФО [165]

Для получения композитов частицы графена вводили в раствор ПАК в ДМАА. Полученную суспензию интенсивно перемешивали в течение 24 ч, после чего обрабатывали ультразвуком с помощью диспергатора IL 10-0.63. Обработку проводили в течение пяти циклов продолжительностью 5 мин с перерывами для охлаждения суспензии. Частота ультразвукового воздействия составляла 22 кГц, мощность 800 Вт.

Плёночные образцы формовали поливом 15 мас.% раствора ПАК на гидрофобизированное стекло. Образцы сушили при 60 °С в течение 24 ч. Термическую имидизацию проводили ступенчато при 100, 200 и 300 °С с

выдержкой 1 ч при каждой температуре. Затем плёнки дополнительно выдерживали при 360 °С в течение 15 мин и охлаждали до комнатной температуры со скоростью 10 °С/мин. После охлаждения плёнки снимали с подложек.

Были получены плёнки ненаполненного полиимида Р-ОДФО и композиты, содержащие 0,5, 1 и 3 массовые части графена на 100 массовых частей полимера. Толщина плёнок составляла 50 ± 5 мкм.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Механические испытания

Для определения механических характеристик плёночных материалов проводили испытания на одноосное растяжение на универсальной испытательной машине Instron 5940 (Instron, Норвуд, Массачусетс, США). Использовали образцы с рабочей зоной шириной 2 мм и длиной 20 мм. Перед испытанием образцы кондиционировали в эксикаторе при относительной влажности 66 % в течение 72 ч.

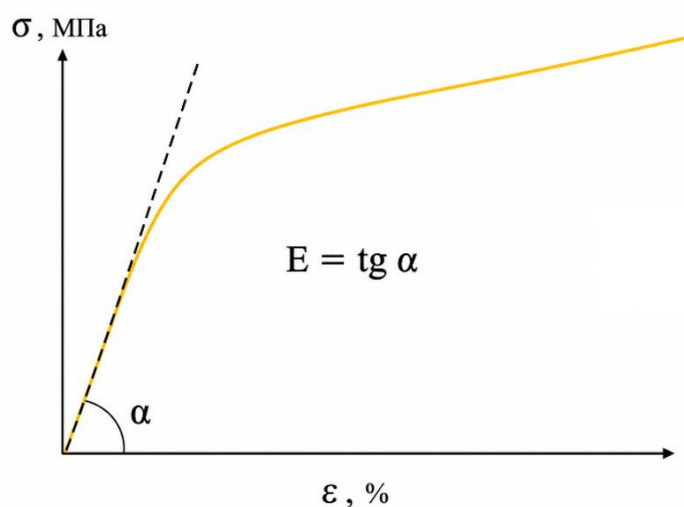


Рисунок 2.4 – Определение модуля упругости по диаграмме растяжения

Испытания проводили при комнатной температуре со скоростью перемещения захватов 10 мм/мин. Для каждого состава исследовали десять образцов. По диаграммам «напряжение–деформация» (Рисунок 2.4) определяли модуль упругости, прочность при растяжении и относительную деформацию при разрыве. Модуль упругости рассчитывали по наклону начального линейного участка диаграммы, прочность при растяжении определяли по максимальному

напряжению, а относительную деформацию при разрыве рассчитывали относительно начальной длины рабочей зоны образца. Для каждой характеристики рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение.

2.3.2 Электронная сканирующая микроскопия

Морфологию поверхности и структуру сколов плёночных образцов исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе SUPRA-55VP (Carl Zeiss, Германия). Исследование проводили в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 5 – 20 кВ с регистрацией вторичных электронов.

Для исследования внешней поверхности высушенные образцы фиксировали на металлических держателях с помощью токопроводящей углеродной ленты. Для анализа структуры плёнок в поперечном сечении образцы подвергали криосколу в жидком азоте. Перед исследованием поверхность образцов и криосколов покрывали тонким слоем платины методом ионно-вакуумного напыления для предотвращения накопления электрического заряда.

Полученные изображения использовали для оценки морфологии поверхности, структуры сколов, наличия пор и дефектов, а также характера распределения наполнителя в полимерной матрице.

2.3.3 Атомно-силовая микроскопия

Рельеф поверхности плёнок исследовали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) на зондовом микроскопе SOLVER PRO (НТ-МДТ, Россия) в контактном режиме Height и Lateral Force. Сканирование проводили на участках размером 20×20 и 1×1 мкм. При перемещении зонда регистрировали изменения высоты поверхности, на основании которых строили трёхмерные изображения рельефа.

Для количественной оценки шероховатости каждого образца анализировали десять участков поверхности. По данным АСМ рассчитывали максимальный перепад высот R_z и среднеквадратичное отклонение высоты поверхности. Полученные параметры использовали для сравнения выраженности и однородности рельефа плёнок разного состава.

2.3.4 Исследование химического состава поверхности методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии

Химический состав и состояние углеродсодержащих групп на поверхности композитных плёнок исследовали методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС). Измерения проводили на магнитном спектрометре с энергетическим разрешением 10^{-4} и светосилой 0,085 % при возбуждении AlK α -излучением с энергией 1486,5 эВ. Регистрировали фотоэлектронные спектры основного уровня C1s.

Метод использовали для сравнения химического состава поверхности исходных полимерных плёнок и композитов с углеродными наполнителями. Поскольку последующее использование материалов предполагало их стерилизацию, сопровождающуюся нагреванием, дополнительно оценивали влияние температурного воздействия на химический состав поверхности. Для этого спектры композита полиимид-3 мас.% графена регистрировали при 25 и 100 °С.

2.3.5 Измерение угла смачивания

Измерение краевого угла смачивания использовали для сравнительной оценки гидрофильности поверхности плёнок разного состава.

Краевой угол смачивания θ композитных плёнок определяли методом сидячей капли с использованием анализатора формы капли DSA30 (Krüss GmbH, Германия) (Рисунок 2.5). Образцы размером 20 × 20 мм фиксировали на горизонтальном столике прибора. На поверхность каждого образца с помощью шприца наносили каплю дистиллированной воды объёмом 5 мкл. Через 5 с профиль капли регистрировали камерой высокого разрешения. Краевой угол смачивания θ рассчитывали по форме капли с использованием программного обеспечения DSA4. Для каждого образца выполняли пять измерений на случайно выбранных участках поверхности, после чего рассчитывали среднее значение θ .

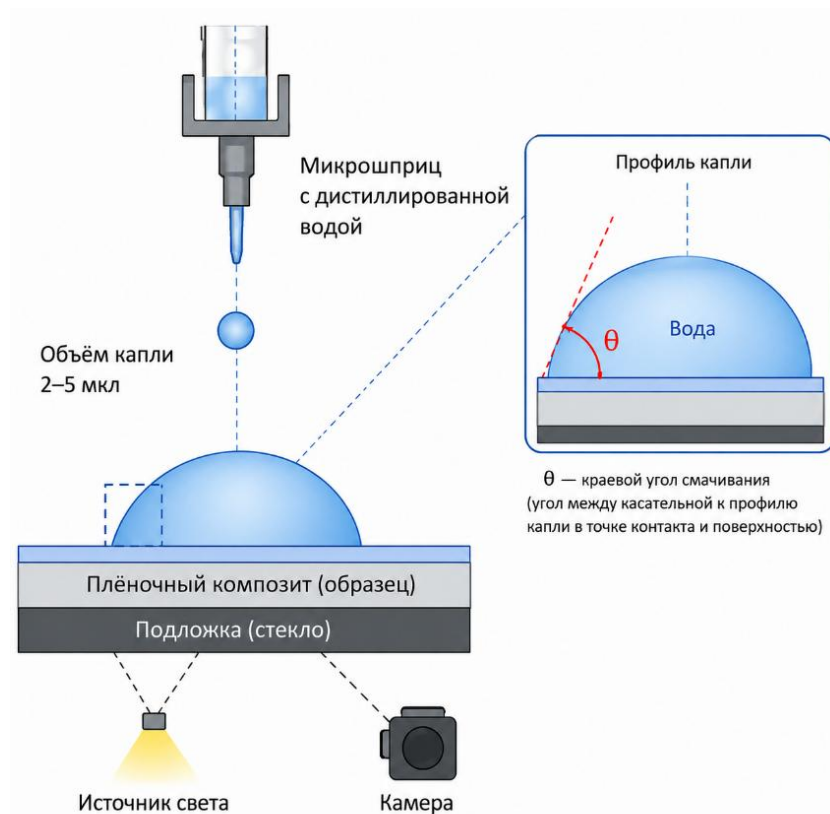


Рисунок 2.5 – Схема определения краевого угла смачивания

2.3.6 Исследование электрофизических характеристик

Электропроводящие свойства исследовали как в сухом виде, так и в условиях, имитирующих физиологическую среду.

Измерения электропроводности сухих плёнок проводили при температуре 22 ± 2 °C с использованием пикоамперметра-источника Keithley 6487 (Tektronix, США) в четырёхконтактной системе по методу Ван-дер-Пау. Данный метод применяли для оценки проводимости плёночных образцов в плоскости материала, что особенно важно для композиционных систем с распределённым электропроводящим наполнителем. Прибор обладает чувствительностью до 10^{-15} А и обеспечивает погрешность измерения тока не более 0,2 %. Для регистрации разности потенциалов применяли милливольтметр В7-40/4.

Перед экспериментом образцы выдерживали при температуре 80 °C в течение 3 ч для удаления сорбированной влаги. Затем на поверхность плёнок наносили четыре электрических контакта, расположенных по периметру образца. В первой

конфигурации (Рисунок 2.6) ток пропускали между контактами 1 и 2, а разность потенциалов измеряли между контактами 3 и 4. По этим данным рассчитывали сопротивление R_1 . Во второй конфигурации ток пропускали между контактами 1 и 3, а напряжение регистрировали между контактами 2 и 4, что позволяло определить сопротивление R_2 . К образцам прикладывали постоянное напряжение 10 В и регистрировали ток в течение 10 мин.

Удельное сопротивление рассчитывали с учётом толщины плёнки и поправочного коэффициента метода Ван-дер-Пау, после чего электропроводность определяли как величину, обратную удельному сопротивлению. Поскольку значения R_1 и R_2 для исследованных образцов существенно не различались, поправочный коэффициент принимали равным единице. Электропроводность определяли как величину, обратную удельному сопротивлению. Полученные значения R_1 и R_2 для исследованных образцов существенно не различались. Это может свидетельствовать о достаточно равномерном распределении проводящих частиц в полимерной матрице.

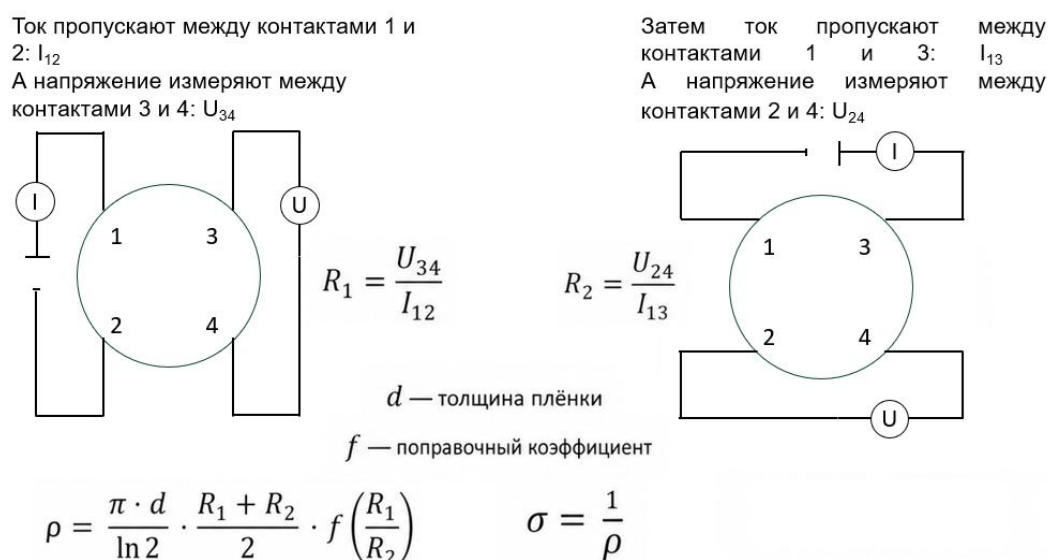


Рисунок 2.6 – Схема измерения удельной электропроводности

Для оценки поведения материалов в условиях, близких к эксплуатации в составе систем клеточной электростимуляции, измеряли вольт-амперные

характеристики плёнок, погружённых в физиологический раствор (0,9 % NaCl). Измерения проводили в тefлоновой ячейке, где образцы фиксировались между двумя платиновыми плоскопараллельными электродами, расположенными на расстоянии 0,9 см. Электрохимические характеристики регистрировали с помощью потенциостата-гальваностата Elins P40 (Россия). На плёнки подавался прямоугольный двухфазный потенциал амплитудой 100 мВ с периодом смены полярности 30 с, при этом регистрировался протекающий через образец электрический ток. Скорость регистрации до 1500 точек/сек. Такой режим выбран с учётом физиологических параметров электростимуляции клеток и тканей.

Полученные данные позволили оценить электропроводность и вольт-амперные характеристики плёнок как в сухом состоянии, так и во влажной среде, что обеспечило комплексное представление об их пригодности в качестве проводящей матрицы для систем биомедицинской электростимуляции.

2.3.7 Клеточные исследования *in vitro*

Культивирование клеток и приготовление растворов проводили в стерильных условиях с использованием ламинарного бокса БМБ-II-"Ламинар-С"-1,2 (Ламинарные системы, Россия). Все работы выполнялись в асептических условиях с применением стерильных одноразовых расходных материалов.

В работе использовали две основные клеточные культуры, соответствующие ключевым компонентам кожного покрова – дермальные фибробласты человека, полученные из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), а также спонтанно трансформированные кератиноциты кожи человека HaCaT, в которые встроен ген красного флуоресцентного белка (RFP, Red Fluorescent Protein), полученные из коллекции клеточных культур Института биологии развития имени Н. К. Кольцова РАН (Москва).

Фибробласты являются основными клетками дермы, участвующими в синтезе коллагена, эластина и других компонентов внеклеточного матрикса, формировании грануляционной ткани и последующем ремоделировании кожи. При изменении функционального состояния этих клеток перестраивается актиновый цитоскелет, меняется степень распластывания, число клеточных

отростков и выраженность стресс-фибрилл. В связи с этим при флуоресцентной микроскопии оценивали организацию актиновых стресс-фибрилл с использованием окрашивания на α -гладкомышечный актин (α -SMA), который позволяет судить о цитоскелетной перестройке и сократительной активности фибробластов. Таким образом, использование фибробластов в данной модели позволило оценить влияние электрического поля не только на жизнеспособность клеток, но и на морфологические признаки их функциональной активности, связанные с процессами регенерации соединительной ткани.

Кератиноциты линии HaCaT представляют собой иммортализованную эпидермальную клеточную линию человека, широко применяемую как модельный объект для изучения пролиферации и миграции клеток эпителия. Эти клетки играют ключевую роль в восстановлении эпидермиса при повреждениях кожи, формируя эпителиальный покров над грануляционной тканью. В работе применялись клетки HaCaT, экспрессирующие красный флуоресцентный белок (RFP), что позволило осуществлять прижизненный контроль их пролиферативной активности и морфологии без дополнительного окрашивания.

Таким образом, одновременное использование фибробластов и кератиноцитов обеспечивало комплексную оценку эффективности электростимуляции, охватывая оба ключевых этапа регенерации кожи – формирование грануляционной ткани и восстановление эпидермального покрова.

Культуры клеток поддерживали в культуральных флаконах с площадью поверхности для роста клеток 25 и 75 см² в полной питательной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % бычьей фетальной сыворотки, L-глутамина, антибиотиков пенициллина, стрептомицина (все реактивы Thermo Fisher Scientific, США) в условиях CO₂-инкубатора 8000 WJ (Thermo Fisher Scientific, США) при концентрации CO₂ 5 %, температуре 37 °C и относительной влажности $\geq$ 95 %.

Пассирование клеток проводили при достижении 90 % конфлюэнтности. Клеточный монослой с поверхности флакона снимали с помощью промывания растворами Хэнкса и Версена (все реактивы ПанЭко, Россия), а затем инкубировали

в присутствии 0,25 % раствора трипсин-ЭДТА (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 5 мин при 37 °С до отхождения клеток. Реакцию фермента нейтрализовали добавлением среды, суспензию собирали и осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 1000 об/мин, супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в свежей среде и проводили подсчёт с помощью счетчика клеток Countess II Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, США), а так же определяли концентрацию клеток в суспензии и жизнеспособность клеток.

Для оценки адгезии клеток к поверхности исследуемых материалов, особенностей их пролиферации и морфологии использовали световой инвертированный микроскоп Primo Vert (Carl Zeiss, Германия). Прижизненные микрофотографии клеток получали с помощью цифровой видеокамеры AxioCam 105 color (Carl Zeiss, Германия) и обрабатывали в программе ZEN 2012 (blue edition) (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Оценка биосовместимости синтезированных матриц с живыми клетками проводилась на основании анализа пролиферативной активности человеческих дермальных фибробластов методом МТТ-теста. Принцип работы данного теста основан на способности митохондриальных дегидрогеназ в метаболически активных и пролиферирующих клетках восстанавливать тетразолиевое соединение 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) в нерастворимые внутриклеточные кристаллы формазана пурпурно-синего цвета (Рисунок 2.7).

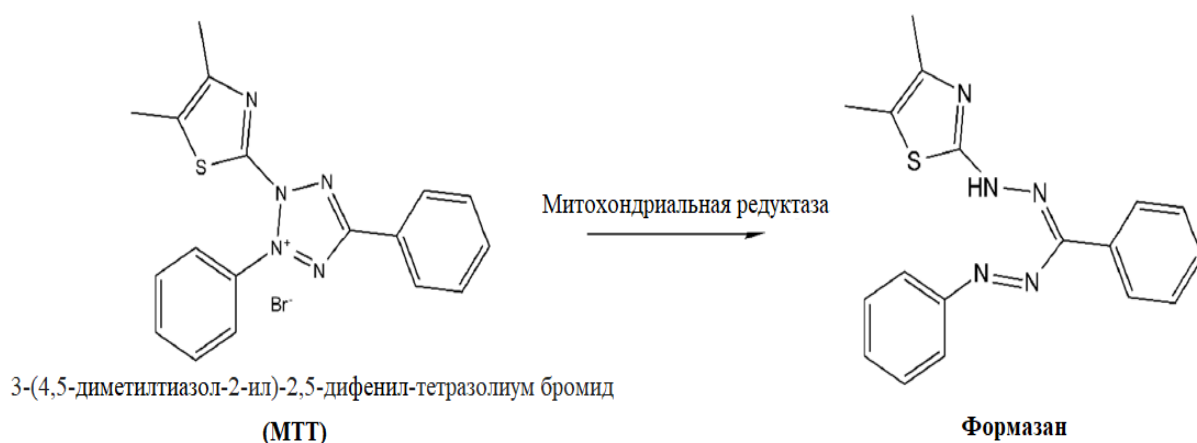


Рисунок 2.7 – Реакция МТТ-теста

Перед проведением МТТ-теста образцы стерилизовали в автоклаве 2540МК (Tuttnauer, Израиль) при температуре 121 °С и давлении 1,6 атм в течение 35 мин. После стерилизации плёнки сохраняли целостность и не имели видимых повреждений. В стерильных условиях их вырезали в форме дисков диаметром 1,6 см.

Для эксперимента использовали 24-луночные культуральные планшеты Nunc с поверхностью Nunclon Delta. Плёнки помещали на дно лунок и фиксировали по периферии силиконовыми кольцами. Это предотвращало их смещение и всплытие после добавления культуральной среды. Клетки высевали непосредственно на поверхность плёнок с плотностью $2,5 \times 10^4$ клеток/см². В каждую лунку добавляли 1 мл полной культуральной среды. Для каждого состава использовали три параллельных образца.

В качестве контроля роста клетки культивировали непосредственно на поверхности культурального полистирола Nunclon Delta в тех же планшетах. В контрольные лунки устанавливали аналогичные силиконовые кольца, но без плёнок. Поэтому доступная для клеток площадь и условия фиксации соответствовали опытным группам. Поверхность Nunclon Delta представляет собой модифицированный культуральный полистирол с повышенной гидрофильностью, предназначенный для адгезии и роста клеток.

Через 2 час после посева осуществляли микроскопическое наблюдение за адгезией и распластыванием клеток на поверхности исследуемых материалов. Затем проводили инкубацию клеток в течение четырех суток в условиях СО₂-инкубатора. По завершении этого периода анализировали морфологические характеристики и распределение клеток на поверхности матриц с использованием микроскопии.

На 1-е и 4-е сутки в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора МТТ (5 мкг/мл) и инкубировали клетки в течение 2 ч. Затем раствор аккуратно удаляли, сохраняя кристаллы формазана, образовавшиеся на поверхности образцов. Для их растворения в каждую лунку добавляли по 1 мл

диметилсульфоксида (ДМСО). Содержимое лунок перемешивали микропипеткой и выдерживали в термошейкере при 37 °C в течение 5 мин в темноте. Полученный раствор формазана переносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета. Для каждого исследуемого материала проводили 9 повторных измерений.

Для регистрации абсорбции формазана использовали длину волны 570 нм, для отсечения фонового сигнала – 690 нм. Оптическую плотность растворов регистрировали с использованием планшетного спектрофотометра SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Германия). Значения оптической плотности служили показателем жизнеспособности клеток. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения MARS Data Analysis Software, Microsoft Office Excel 16. Методы параметрической статистики включали в себя определение показателей: $\bar{x}$ – среднее арифметическое, m – средняя ошибка средней арифметической. Результаты выражали в единицах оптической плотности.

2.3.8 Экспериментальная установка для исследования влияния электрического поля на жизнедеятельность клеток

Для проведения экспериментов по исследованию влияния электрического поля на адгезию и пролиферацию клеток, была разработана и изготовлена специальная тефлоновая ячейка, выполненная методом механической обработки из цельных блоков без применения клеевых соединений. Использование тефлона обеспечивает химическую инертность, отсутствие токсичности, биосовместимость и возможность многократной стерилизации.

Конструкция ячейки является сборной и включает три функциональных элемента (Рисунок 2.8). Основным элементом ячейки – корпус-ванна, представляющая собой прямоугольный тефлоновый блок с внутренней полостью, которая служит рабочей камерой, куда помещается электропроводящая полимерная матрица. Ванна обеспечивает герметичное удержание культуральной среды или физиологического раствора, при этом исключает утечку жидкости. Вторым элементом – рамка с системой пазов и выступов. Рамка устанавливается поверх корпуса и обеспечивает механическое прижатие исследуемой плёнки к дну ванны, предотвращая её

смещение в процессе эксперимента. Конструкция рамки дополнительно формирует гнёзда для фиксации электродных пластин. Третий элемент конструкции – съёмные пластины, вставляемые в пазы рамки. Каждая пластина снабжена закреплённым на нижнем торце рабочим электродом из платиновой проволоки диаметром 1 мм и длиной 50 мм. Электроды располагаются параллельно друг другу на расстоянии 9 мм, что позволяет формировать равномерное электрическое поле в объёме культуральной среды над образцом. Платиновые электроды устойчивы к коррозии и не вносят ионных примесей в раствор, что делает их безопасными для клеточных культур.

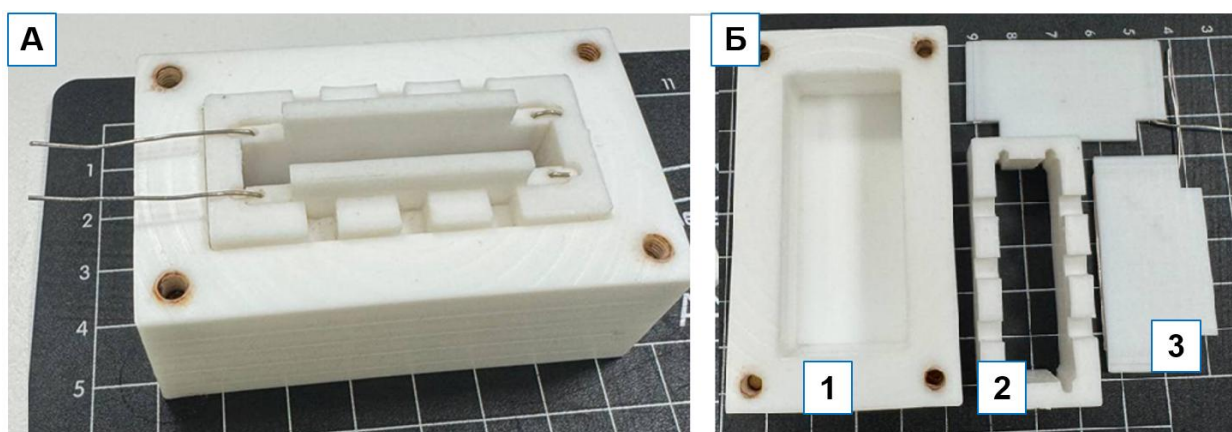


Рисунок 2.8 – Фотографии ячейки для электростимуляции в сборе (А) и разобранном виде (Б): 1 – корпус-ванна, 2 – фиксирующая рамка, 3 – съёмные пластины с электродами

Собранная ячейка обеспечивала надёжную фиксацию электропроводящей матрицы, герметичность рабочей камеры и необходимый газообмен. После установки плёнки и внесения культуральной среды рамка и съёмные пластины фиксировали образец, а платиновые электроды прижимались к поверхности электропроводящей плёнки по её краям. Электроды не контактировали непосредственно с клеточным слоем, расположенным на центральной части образца, при этом их контакт с культуральной средой был ограничен областью прилегания к плёнке. Подключение к потенциостату позволяет подавать электрический сигнал с заданными параметрами (амплитуда, частота, форма сигнала) и регистрировать протекающий ток. Такая конструкция обеспечивает

воспроизводимость условий стимуляции, исключает утечку среды и позволяет проводить долговременные эксперименты с клеточными культурами в условиях *in vitro*.

2.3.9 Выбор параметров и экспериментальных схем электростимуляции клеточных культур *in vitro*

Электропроводящие свойства материала, его биосовместимость и функциональные характеристики оказывают значительное влияние на эффективность электростимуляции. Однако, не менее важным фактором является выбор режима электрического воздействия, включающего напряжение, плотность и форму тока. При выборе параметров стимуляции был проведён анализ литературных данных, а также учтены физиологические особенности функционирования клеток.

Биоэлектрические процессы в живых тканях связаны с направленным переносом ионов через клеточные мембраны, работой ионных каналов, насосов и транспортеров [166]. Мембранный потенциал при этом является одним из ключевых параметров функционального состояния клетки: для многих клеток потенциал покоя находится в области отрицательных значений, обычно порядка десятков милливольт, а при возбуждении или деполяризации мембраны может кратковременно смещаться к менее отрицательным и даже положительным значениям [167]. Поэтому, при выборе режима электростимуляции учитывали, что клеточные системы чувствительны к низкоинтенсивным электрическим воздействиям, сопоставимым по порядку величины с естественными биоэлектрическими сигналами.

В работе использовали низкочастотный переменный сигнал. Такой режим был выбран не только как более мягкий для клеточной культуры, но и как способ снизить нежелательные эффекты, характерные для длительного воздействия постоянного тока. При постоянной полярности возможно накопление заряда на электродах, развитие локального электрохимического дисбаланса, изменение свойств среды и образование продуктов электродных реакций, что повышает риск

повреждения клеток [168]. Смена полярности позволяет уменьшить выраженность этих процессов и обеспечить более стабильные условия стимуляции.

В качестве физиологически обоснованных ориентиров рассматривали микроамперный диапазон токов и низкочастотные режимы воздействия. Согласно литературным данным, в повреждённых тканях регистрируются эндогенные токи порядка единиц-сотен мкА/см² [169], а электрические поля, влияющие на миграцию и активность клеток, часто находятся в диапазоне десятков-сотен мВ/мм [170]. С учётом этих данных в работе были выбраны мягкие параметры электростимуляции: амплитуда 100 мВ и смена полярности каждые 30 с. Такой режим рассматривался как низкоинтенсивное биоэлектрическое воздействие, приближенное к физиологическим условиям и не вызывающее выраженного повреждающего эффекта на клетки.

В работе были апробированы две экспериментальные схемы электростимуляции клеточных культур. Первая схема предусматривала прямое культивирование клеток на поверхности электропроводящей плёночной матрицы (Рисунок 2.9). На первом этапе электропроводящую плёнку помещали на дно тefлоновой ячейки и фиксировали прижимной рамкой, обеспечивая её плотный контакт с электродами и исключая смещение образца в ходе эксперимента. После этого на поверхность плёнки вносили клеточную суспензию фибробластов в полной культуральной среде.

В качестве электропроводящих матриц использовали композитные хитозановые плёнки, модифицированные ОСУНТ, а также плёнки на основе полиимида Р-ОДФО с добавлением графена. Такая схема обеспечивала непосредственный контакт клеточного слоя с поверхностью проводящего материала и позволяла оценить влияние состава матрицы, концентрации электропроводящего наполнителя и параметров подаваемого сигнала на адгезию и пролиферативную активность клеток.

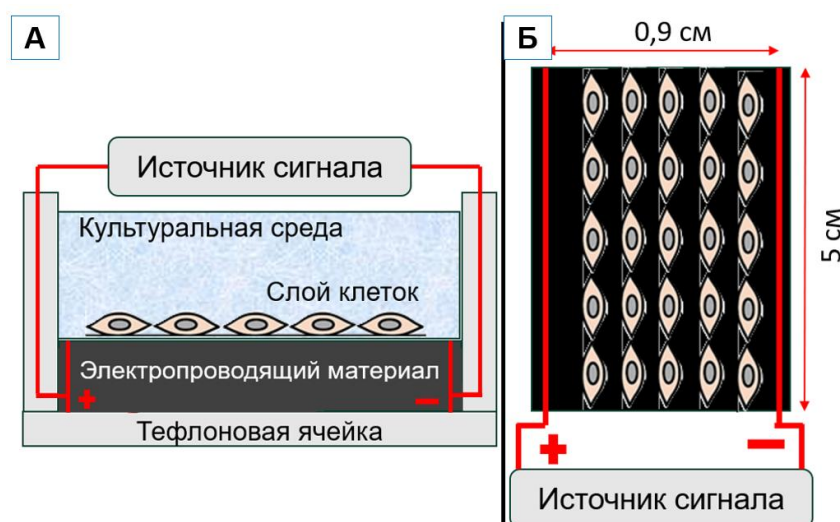


Рисунок 2.9 – Схема электростимуляции клеток при прямом контакте с электропроводящей плёночной матрицей: А – ячейка в разрезе, Б – вид сверху

Вместе с тем, первая схема имела ряд ограничений. Клетки находились в прямом контакте с поверхностью, содержащей углеродный наполнитель, поэтому их ответ определялся не только действием электрического поля, но и химическим составом поверхности, её шероховатостью, гидрофильностью и локальным распределением проводящей фазы. Кроме того, при неоднородном распределении наполнителя возможно формирование участков с различной плотностью тока и локальным изменением потенциала. Поэтому данная схема рассматривалась как исходная модель для оценки электропроводящих материалов.

Вторая схема электростимуляции была разработана как более мягкая и физиологически близкая конфигурация воздействия (Рисунок 2.10). В её основе лежала двухкомпонентная система, включающая ионопроводящую хитозановую плёнку и электронно-проводящий композит на основе полиимида Р-ОДФО, содержащего графен. Такая конструкция рассматривалась не только как модель для культивирования клеток *in vitro*, но и как прототип двухслойного биоэлектрода, перспективного для последующего использования при электростимуляции раневых поверхностей.

В отличие от первой схемы, клетки не контактировали непосредственно с полиимид-графеновой матрицей. На дно тefлоновой ячейки помещали

проводящую полиимид-графеновую плёнку, сверху на неё укладывали хитозановую плёнку, после чего на поверхность хитозана высевали клетки в полной культуральной среде. Хитозановая плёнка плотно прилегала к проводящему слою и выполняла роль промежуточного интерфейса между клетками и электронным проводником. В обоих вариантах эксперимента высота слоя культуральной среды над клетками составляла 0,5 см.

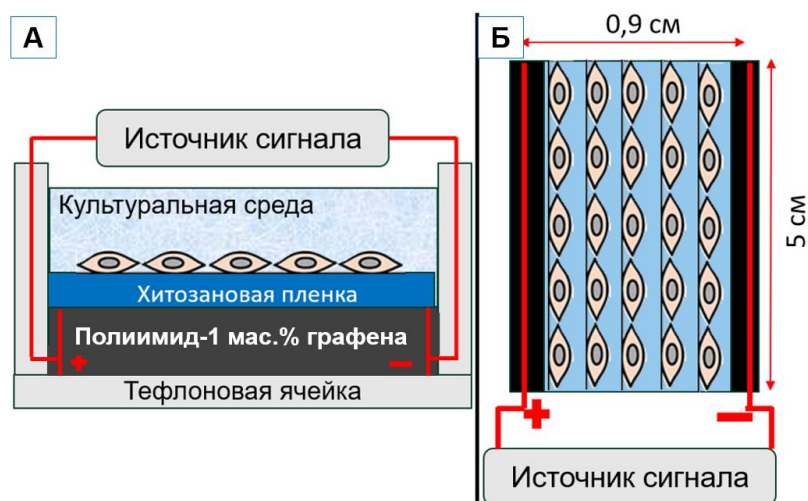


Рисунок 2.10 – Схема электростимуляции клеток во второй экспериментальной конфигурации с промежуточным хитозановым слоем:

А – ячейка в разрезе, Б – вид сверху

Принципиальной особенностью данной схемы было функциональное разделение слоёв. Хитозановая матрица, находящаяся в непосредственном контакте с клетками, обеспечивала благоприятную поверхность для адгезии и роста клеток, а в гидратированном состоянии проявляла ионную проводимость, что особенно важно для передачи воздействия в условиях, приближенных к биологической среде. Кроме того, хитозан известен своей биосовместимостью, способностью поддерживать клеточную адгезию и создавать мягкий интерфейс с тканью. Полиимид-графеновый слой, напротив, выполнял прежде всего функцию электронно-проводящего подложечного элемента. Он обеспечивал подключение к внешнему источнику сигнала, механическую прочность конструкции и более равномерное распределение электрического воздействия по площади образца.

Такое раздельное сочетание ионопроводящего контактного слоя и электронно-проводящего несущего слоя позволило уменьшить влияние собственных поверхностных свойств углеродсодержащего композита на клеточный ответ. В результате во второй схеме оценивалось преимущественно действие самого электрического сигнала, тогда как вклад различий в химии и микрорельефе проводящей поверхности становился менее выраженным. Это повышало воспроизводимость эксперимента и делало интерпретацию результатов более корректной.

Сравнение двух подходов показало, что вторая схема обладает рядом преимуществ. Хитозановая сторона обеспечивала непосредственный контакт клеток с биосовместимой поверхностью и способствовала более стабильной адгезии клеточного слоя, тогда как полиимид-графеновый композит служил надёжным токоподводящим элементом. Тем самым удавалось совместить биологически благоприятные свойства хитозановой матрицы с высокой электрической проводимостью и стабильностью электронного проводника.

2.3.10 Методика проведения электростимуляции клеток на плёночных матрицах *in vitro*

Перед электростимуляцией электропроводящие плёнки промывали физиологическим раствором с нейтральным pH и стерилизовали в автоклаве при 121 °C в течение 40 мин. Стерилизацию проводили в собранной тefлоновой ячейке для электростимуляции, плёнка находилась на дне ванны и была зафиксирована между прижимной рамкой и электродными пластинами. После стерилизации дальнейшие манипуляции с клеточными культурами выполняли в асептических условиях.

На поверхность электропроводящей плёнки вносили суспензию клеток в полной питательной среде при посевной плотности $2,5 \times 10^4$ кл/см². Высота слоя культуральной среды над клетками составляла 0,5 см. Собранную ячейку помещали в CO₂-инкубатор (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °C, 5 % CO₂ и повышенной влажности. Через 24 ч после посева, после прикрепления клеток к поверхности материала, проводили электростимуляцию. Воздействие осуществляли в

стерильных условиях непосредственно в CO₂-инкубаторе, без извлечения клеточной культуры из контролируемой газовой и температурной среды. В качестве контрольной группы использовали клетки, прошедшие аналогичные этапы культивирования, но без воздействия электрического поля.

Электростимуляцию проводили с использованием потенциостата-гальваностата ELINS P-30J (Россия), позволяющего регистрировать токи в диапазоне от 10 нА до 2 А и напряжения от 80 мкВ до 15 В при максимальной скорости регистрации сигнала 1580 точек/с. На образцы подавали П-образный потенциал с амплитудой 100 и 500 мВ и сменой полярности каждые 30 с. Смена полярности была необходима для уменьшения поляризации электродов, ограничения накопления заряда на границе раздела «электрод–плёнка–среда» и снижения вероятности локальных электрохимических изменений среды при длительном воздействии. Такой режим позволял поддерживать низкоинтенсивное электрическое воздействие без выраженного смещения среднего потенциала системы в одну сторону.

Продолжительность электростимуляции составляла от 1 до 4 ч в непрерывном режиме. В процессе эксперимента регистрировали изменение тока, протекающего через систему «электрод–плёнка–среда». При подаче потенциала наблюдались кратковременные пиковые значения тока, после чего ток снижался, что связано с перезарядкой межфазных границ и формированием двойного электрического слоя. При этом характер токового ответа сохранялся в течение всего времени стимуляции без выраженного падения амплитуды сигнала, что указывает на стабильность электрофизического поведения системы в выбранных условиях.

На рисунке 2.11 представлена временная развертка подаваемого потенциала и тока, регистрируемого при электростимуляции плёночной матрицы в диапазоне ± 100 мВ. Видно, что при непрерывном циклировании в течение 4 ч форма токового ответа сохраняется как в начале эксперимента, так и на завершающем этапе. Подобный характер изменения тока был типичен для всех исследованных плёночных материалов, что указывает на стабильность их электрофизического поведения в выбранном режиме стимуляции. Таким образом, полученные матрицы

могут быть использованы для продолжительной электростимуляции клеточных культур *in vitro* без выраженного изменения проводящих свойств в ходе эксперимента.

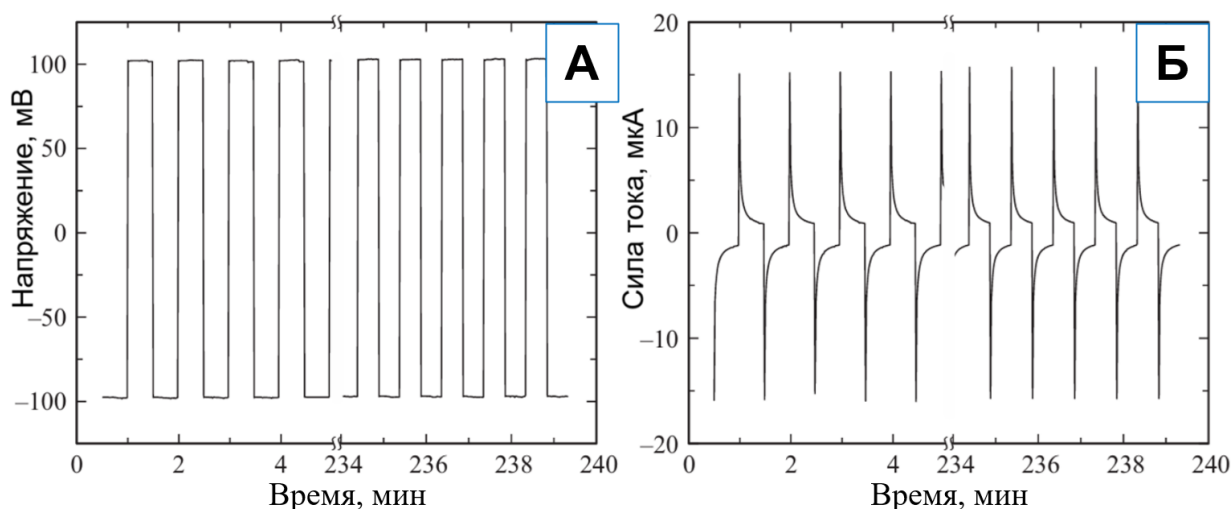


Рисунок 2.11 – Временная развертка электрического сигнала при электростимуляции плёночных матриц *in vitro*: А – форма подаваемого прямоугольного потенциала с амплитудой 100 мВ; Б – ток, протекающий через систему «электрод-плёнка-среда»

2.3.11 Исследование жизнедеятельности и пролиферативных особенностей клеток с помощью клеточного анализатора iCELLigence

Клеточные исследования занимают промежуточное положение между биохимическими тестами на молекулярном уровне и комплексными экспериментами *in vivo*, поэтому они являются важным инструментом как фундаментальной, так и прикладной биологии. Для оценки влияния электростимуляции на поведение клеток использовали систему RTCA iCELLigence (ACEA Biosciences, США), работающую по принципу безметочного анализа клеточного импеданса в реальном времени (Рисунок 2.12). Данный метод был выбран как дополнение к МТТ-тесту, поскольку он позволяет регистрировать не только конечное значение клеточной активности, но и непрерывную динамику клеточного ответа после воздействия электрического поля. Это особенно важно при анализе электростимуляции, так как клеточный ответ может проявляться не сразу,

а через изменение скорости адгезии, распластывания и последующей пролиферации.

Функциональной основой метода служит электронный планшет E-Plate L8, на дне каждой лунки которого расположены золотые встречно-штыревые микроэлектроды. Расстояние между центрами соседних лунок составляет 9 мм, что соответствует стандарту ANSI/SBS 4-2004 для 96-луночных микротитровальных планшетов. При отсутствии клеток электрический ток свободно проходит через культуральную среду между электродами, а регистрируемый импеданс соответствует базовому уровню. После прикрепления клеток к поверхности электродов они частично экранируют токопроводящую поверхность и изменяют локальные свойства интерфейса «электрод–среда». Рост импеданса связан с увеличением числа клеток на поверхности электродов, изменением их морфологии, площади контакта с субстратом и характера межклеточных взаимодействий

Полученный сигнал пересчитывается программным обеспечением в интегральный показатель Cell Index (CI), или клеточный индекс. Значение CI зависит от количества прикреплённых клеток, площади их распластывания, прочности адгезии, морфологии и характера межклеточных контактов. Поэтому данный показатель не является прямым подсчётом числа клеток, но позволяет количественно оценивать динамику жизнедеятельности клеточной популяции в реальном времени [171].

Типичная кривая CI включает несколько участков (Рисунок 2.13). Сразу после посева наблюдается быстрый рост клеточного индекса, связанный с прикреплением клеток к электродной поверхности и их начальным распластыванием. Далее, в фазе активного роста, CI увеличивается более плавно, что отражает пролиферацию клеток и увеличение площади покрытия электродов. После формирования плотного монослоя кривая выходит на плато. При ухудшении состояния культуры, гибели клеток или их отрыве от поверхности электродов значение CI снижается. Таким образом, форма кривой позволяет оценить не только общую пролиферативную активность, но и характер клеточной адгезии, скорость роста и устойчивость сформированного монослоя.

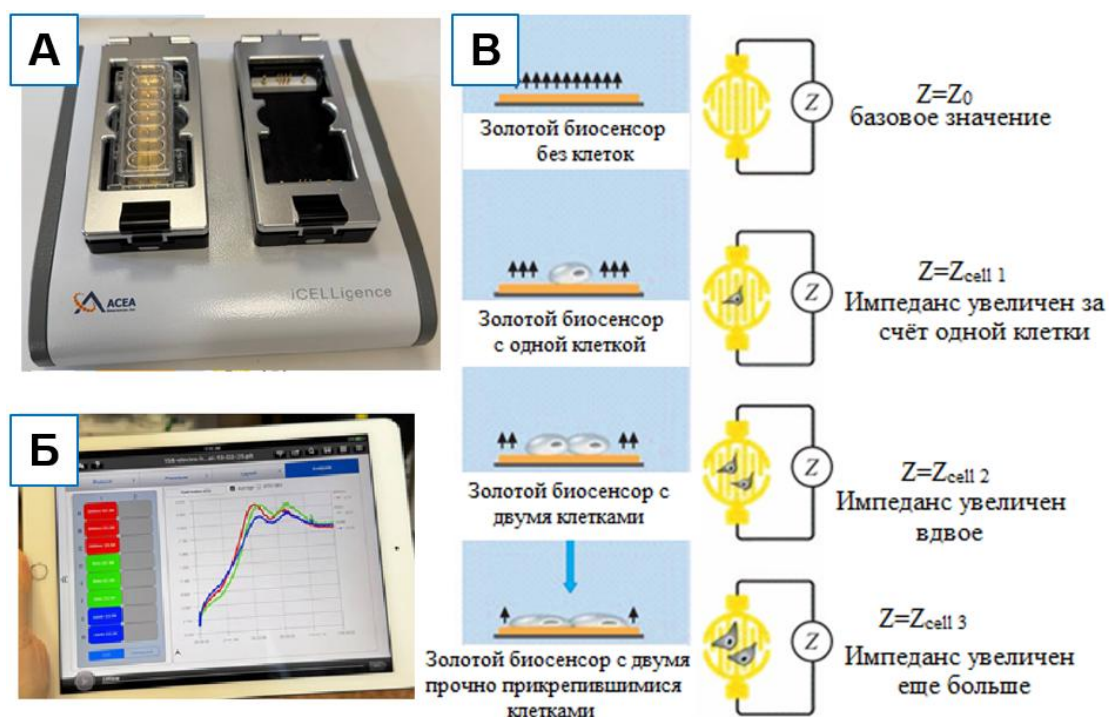


Рисунок 2.12 – Принцип работы системы RTCA iCELLigence для анализа клеточного импеданса в реальном времени: А –общий вид анализатора RTCA iCELLigence с электронным планшетом E-Plate L8; Б –регистрация кривых Cell Index в процессе культивирования клеток; В – схема изменения импеданса золотого биосенсора при прикреплении и распластывании клеток

В настоящей работе RTCA iCELLigence использовали для сравнительной оценки клеток после электростимуляции и контрольных клеток, не подвергавшихся воздействию электрического поля. Такой подход позволял определить, изменяет ли электростимуляция последующую адгезию и пролиферацию фибробластов и кератиноцитов, а также выявить различия между режимами воздействия и типами плёночных матриц.

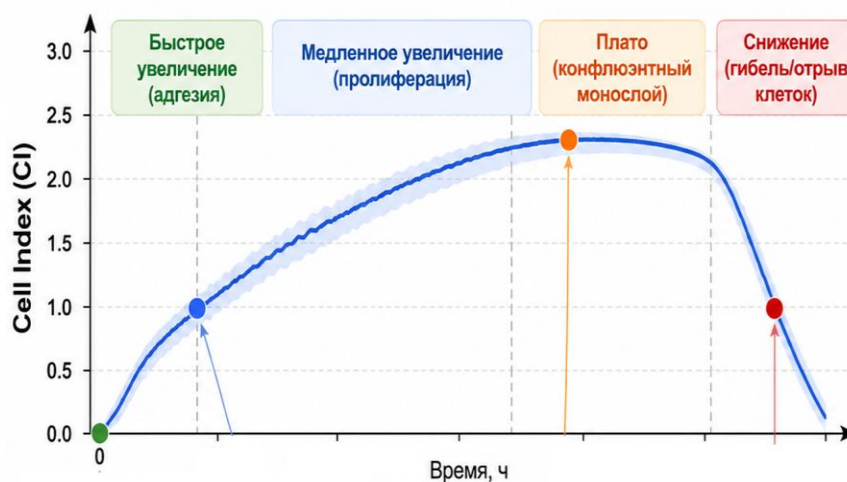


Рисунок 2.13 – Сопоставление основных этапов жизнедеятельности клеточной культуры с траекторией изменения клеточного индекса CI

Через 1 ч после завершения электростимуляции клетки аккуратно снимали с поверхности плёночных матриц и ресуспендировали в свежей полной питательной среде. Затем полученную клеточную суспензию переносили в электронный 8-луночный планшет E-Plate L8 анализатора RTCA iCELLigence. Фибробласты высевали из расчёта 3×10^4 клеток на лунку, кератиноциты HaCaT – 2×10^4 клеток на лунку; объём среды в каждой лунке составлял 500 мкл. В контрольную группу включали клетки, культивированные в тех же условиях на материалах и перенесённые в планшет аналогичным образом, но без предварительного воздействия электрического поля.

После посева планшет устанавливали в станцию анализатора RTCA iCELLigence, расположенную в CO₂-инкубаторе. Регистрацию сигнала проводили автоматически в течение 6 суток при 37 °C, 5 % CO₂ и влажности ≥ 95 %. Интервал между измерениями составлял 15 мин. Полученные временные зависимости обрабатывали с использованием программного обеспечения RTCA.

Для каждой экспериментальной группы строили кривые изменения клеточного индекса во времени. При анализе учитывали начальный участок кривой, соответствующий прикреплению и распластыванию клеток после повторного посева, последующий рост показателя в фазе активной пролиферации, а также выход культуры на плато. Сравнение стимулированных и контрольных групп

позволяло оценить, как электрическое воздействие на плёночных матрицах влияло на дальнейшую адгезионную способность, скорость роста и общее состояние клеточной популяции.

2.3.12 Оценка морфологии и цитоскелета клеток методом флуоресцентной микроскопии

Визуализацию клеток после электростимуляции проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Axio Scope.A1 (ZEISS, Германия). Метод применяли для оценки морфологии клеток, характера их распределения, плотности клеточного слоя, а также изменений цитоскелета, возникающих после воздействия электрического поля.

После завершения электростимуляции клетки высевали на стекла и инкубировали в полной культуральной среде в течение 3 суток при 37 °C, 5 % CO₂ и повышенной влажности. Только после этого проводили флуоресцентный или иммунофлуоресцентный анализ. В качестве контроля использовали интактные клетки, высаженные с той же плотностью и культивированные в аналогичных условиях, но без предварительного воздействия электрического поля.

Для анализа фибробластов использовали окрашивание на α -гладкомышечный актин (α -SMA) мышинными моноклональными антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa Fluor 488 (клон 1A4, Thermo Fisher Scientific, США). Данный маркер применяли для оценки изменений сократительного аппарата и цитоскелетной организации клеток после электростимуляции. Дополнительно у фибробластов оценивали организацию актинового цитоскелета и формирование актиновых стресс-фибрилл. Для этого проводили окрашивание F-актина с использованием Texas Red-X Phalloidin (Thermo Fisher Scientific, США). Ядра клеток окрашивали DAPI, что позволяло оценивать распределение клеток и нормировать флуоресцентный сигнал на количество клеток.

Иммунофлуоресцентное окрашивание фибробластов проводили после фиксации клеток в 4 % растворе формальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре. После фиксации образцы трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), затем проводили пермеабиллизацию в 0,1 % растворе Triton X-100 в

течение 5 мин. Для снижения неспецифического связывания клетки инкубировали в блокирующем растворе, содержащем 2 % бычьего сывороточного альбумина, в течение 30 мин. Далее образцы инкубировали с антителами против α -SMA в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывки проводили окрашивание F-актина Texas Red-X Phalloidin, после чего препараты монтировали в антифейд-среде с DAPI (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI, Thermo Fisher Scientific, США) и накрывали покровным стеклом.

Кератиноциты линии HaCaT, экспрессирующие красный флуоресцентный белок RFP, анализировали в режиме прижизненной флуоресцентной визуализации без дополнительной фиксации и окрашивания. Это позволяло оценить распределение клеток, плотность монослоя и морфологические изменения в ответ на электростимуляцию без нарушения структуры клеточной культуры.

Флуоресцентный анализ проводили с использованием стандартных фильтров для каналов DAPI, Alexa Fluor 488, Texas Red и RFP. Для корректного сравнения контрольных и стимулированных образцов параметры экспозиции и усиления сигнала сохраняли одинаковыми внутри каждой серии экспериментов. Для каждого образца фиксировали не менее пяти случайно выбранных полей зрения.

Цифровую обработку изображений выполняли с использованием программного обеспечения ZEN blue, входящего в комплект микроскопа. При анализе учитывали наличие и распределение клеток на поверхности образцов, плотность клеточного слоя, характер распластывания, выраженность клеточных отростков, организацию актинового цитоскелета и наличие стресс-фибрилл. Сравнение контрольных и стимулированных групп позволяло оценить влияние электрического поля на морфологию, цитоскелетную организацию и функциональное состояние фибробластов и кератиноцитов.

2.3.13 Электростимуляция *in vivo*

Тестирование *in vivo* прототипа электростимулирующего устройства для ускорения заживления кожных повреждений проводили в ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» в лаборатории нейрехимии физиологического

отдела им. И.П. Павлова. Все манипуляции с животными выполняли с соблюдением этических требований и правил ухода за лабораторными животными.

Для эксперимента были отобраны две крысы-самцы линии Wistar массой 350 – 450 г. Животным моделировали две полнослойные кожные раны одинакового размера на дорсальной поверхности тела: одну в области грудного отдела позвоночника, вторую – в каудальной части спины, ближе к хвосту (Рисунок 2.14). Наличие двух ран у одного животного позволяло проводить сравнение опытного и контрольного дефектов в пределах одного организма, что уменьшало влияние индивидуальных различий между животными.



Рисунок 2.14 – Создание открытых ран на крысе

В качестве стимулируемой зоны выбирали рану, расположенную ближе к хвосту. Такое расположение было более удобным для фиксации электродного элемента и вывода проводов к внешнему источнику сигнала, так как снижало натяжение проводов при движении животного и уменьшало риск смещения конструкции под послеоперационной попоной. Кроме того, одинаковое расположение стимулируемой раны у всех животных позволяло стандартизировать схему эксперимента. Вторая рана, расположенная ближе к голове, служила контрольной и обрабатывалась по стандартному протоколу ухода.

За час до операции животных переносили в операционное помещение. Для премедикации вводили Рометар в объёме 100 мкл за 10 мин до введения Золетила в дозировке 30 мг/кг. После наступления анестезии шерсть на спине сбрасывали от

шейного до крестцового отдела позвоночника. Кожу обрабатывали раствором йода по периметру двух окружностей диаметром 1,5 см. Затем по разметке иссекали кожные лоскуты с формированием полнослойных открытых ран. После создания дефектов раневую поверхность обрабатывали хлоргексидином.

Края раневых дефектов дополнительно подшивали для фиксации формы и площади раны (Рисунок 2.15). Это было необходимо для уменьшения быстрого механического стягивания кожи, характерного для грызунов, и для сохранения сопоставимой геометрии ран в течение эксперимента. Такая фиксация повышала воспроизводимость модели и позволяла корректнее оценивать динамику закрытия раневой поверхности по данным фотофиксации.



Рисунок 2.15 – 2 день после операции

После операции животных одевали в послеоперационные попоны (Рисунок 2.16). Попона представляла собой тканевую повязку на липучках с отверстиями для передних и задних лап; в области спины она фиксировалась таким образом, чтобы обе раны оставались доступными для обработки, наложения повязок и электродов. Повязки располагали под попоной и дополнительно фиксировали её элементами, что предотвращало их смещение при движении животного.

Электростимуляцию начинали на вторые сутки после операции. Для воздействия использовали параметры напряжения, частоты и формы сигнала, обоснованные в источниках литературы как физиологические. Электродный элемент располагали непосредственно на поверхности каудальной раны так, чтобы он полностью перекрывал область дефекта. При использовании двухслойной конструкции контакт с раневой поверхностью обеспечивала хитозановая сторона, тогда как полиимид-графеновый слой выполнял функцию проводящего токоподводящего элемента.

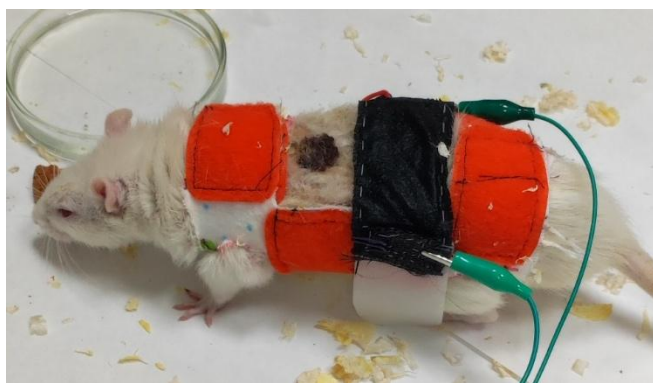


Рисунок 2.16 – Крыса в послеоперационной попоне, фиксирующей электродную систему

На электродный элемент подавали прямоугольный двухфазный потенциал с амплитудой 100 мВ и сменой полярности каждые 30 с. Продолжительность одного сеанса электростимуляции составляла 1 ч. В ходе процедуры потенциостат непрерывно регистрировал общий ток в электрической цепи, включавшей слои электродного элемента и раневую среду. Распределение тока между полиимид-графеновой плёнкой, хитозановым покрытием и тканями раны отдельно не определяли.

После завершения сеанса провода отсоединяли, а двухслойное покрытие оставляли на ране под послеоперационной попоной. Через 24 ч перед следующей процедурой покрытие снимали и проводили фотофиксацию раны. Хитозановую плёнку, непосредственно контактировавшую с раневой поверхностью, заменяли и утилизировали. Полиимид-графеновый электродный элемент сохраняли и

использовали при последующих сеансах с новой хитозановой плёнкой. После этого покрытие повторно фиксировали на ране и проводили следующий сеанс электростимуляции.

Контрольную рану обрабатывали по стандартному протоколу с использованием повязок, смоченных раствором хлоргексидина. Смену контрольной повязки проводили одновременно со сменой электродного элемента и фотофиксацией. Электростимуляцию прекращали на 19-е сутки, когда на стимулированной ране формировалось полное грануляционное покрытие; соседняя рана в этот период продолжала заживать по стандартному протоколу ухода.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Механические свойства композиционных плёнок

В рамках поставленных задач были изучены механические характеристики изготовленных композиционных плёнок, которые определяли в режиме одноосного растяжения. На первом этапе с помощью программного обеспечения Bluehill на универсальной испытательной машине Instron 5940 были получены диаграммы растяжения плёнок, что позволило определить основные механические характеристики: разрывная прочность (σ_p), модуль упругости (E) и относительная деформация при разрыве (ε_p). Характерные диаграммы «напряжение–деформация» плёнок с различным содержанием ОСУНТ представлены на рисунке 3.1. Для каждого состава показана одна кривая, выбранная из серии десяти испытаний.

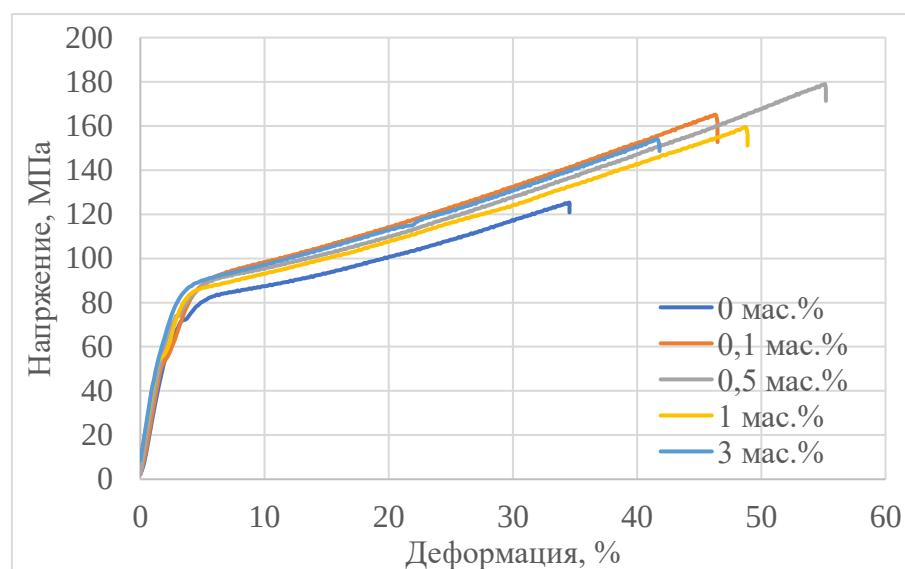


Рисунок 3.1 – Характерные диаграммы «напряжение–деформация» плёнок хитозан-ОСУНТ с различным содержанием ОСУНТ

Результаты механических испытаний (Таблица 3.1) показывают, что введение ОСУНТ в хитозановую матрицу приводит к изменению всего комплекса деформационно-прочностных характеристик. Ненаполненная хитозановая плёнка характеризовалась $\sigma_p = 128 \pm 12$ МПа, $E = 2,62 \pm 0,57$ ГПа и $\varepsilon_p = 36,7 \pm 4,8$ %. Такие значения соответствуют достаточно прочному и при этом нехрупкому плёночному материалу.

Добавление 0,1 мас.% ОСУНТ сопровождалось увеличением σ_p до 157 ± 15 МПа и ε_p до $46,1 \pm 8,1$ %. Одновременно возрастал модуль упругости, что указывает на армирующее действие углеродных нанотрубок. Вероятно, при низком содержании наполнителя ОСУНТ достаточно равномерно распределяются в объёме полимерной матрицы и повышают сопротивление материала растяжению без выраженного охрупчивания.

Наиболее благоприятное сочетание механических свойств наблюдалось для плёнок, содержащих 0,5 мас.% ОСУНТ. Для этого состава σ_p достигала 179 ± 5 МПа, а ε_p увеличивалась до $57,6 \pm 3,6$ %. При этом E составлял $3,22 \pm 0,37$ ГПа, то есть оставался выше, чем у ненаполненного хитозана. Такой результат свидетельствует о формировании эффективной армирующей структуры, при которой нанотрубки повышают прочность и жёсткость материала, но ещё не вызывают заметного снижения пластичности. Увеличение концентрации ОСУНТ в хитозане более 0,5 мас.% может приводить к образованию кластеров вследствие агрегации нанотрубок, которые будут являться концентраторами напряжений при растяжении композитных плёнок хитозан-ОСУНТ.

Таблица 3.1 – Механические характеристики композиционных плёнок хитозан-ОСУНТ

Наименование образца	Разрывная прочность σ_p , МПа	Модуль упругости E , ГПа	Относительная деформация при разрыве ε_p , %
Хитозан	128 ± 12	$2,62 \pm 0,57$	$36,7 \pm 4,8$
Хитозан-0,1 мас.% ОСУНТ	157 ± 15	$3,23 \pm 0,24$	$46,1 \pm 8,1$
Хитозан-0,5 мас.% ОСУНТ	179 ± 5	$3,22 \pm 0,37$	$57,6 \pm 3,6$
Хитозан-1 мас.% ОСУНТ	161 ± 8	$3,35 \pm 0,27$	$47,1 \pm 2,3$
Хитозан-3 мас.% ОСУНТ	158 ± 17	$3,57 \pm 0,26$	$41,2 \pm 5,8$

Действительно, при дальнейшем увеличении концентрации ОСУНТ в хитозане более 0,5 мас.% , то есть до 1 % и 3 % наблюдается тенденция к снижению

прочности и уменьшению деформация до разрушения плёнки, хотя модуль упругости продолжает расти до 3,6 ГПа.

Приведённые в таблице 3.2 данные позволяют оценить влияние графена на механические свойства плёнок на основе полиимида Р-ОДФО. Для применения в качестве токоподводящих элементов и подложек при электростимуляции такие материалы должны сохранять достаточную прочность, гибкость и устойчивость к технологическим манипуляциям, в том числе при работе во влажной среде.

Ненаполненная плёнка полиимида характеризовалась $\sigma_p = 95 \pm 3$ МПа, $E = 1,82 \pm 0,17$ ГПа и $\varepsilon_p = 46,8 \pm 3,4$ %. Введение графена приводило к закономерному увеличению жёсткости материала: E возрастал от $2,20 \pm 0,19$ ГПа при 0,5 мас.% графена до $5,15 \pm 0,62$ ГПа при 3 мас.% графена. Такой эффект связан с высокой жёсткостью графеновых частиц и их армирующим влиянием на полиимидную матрицу.

Таблица 3.2 – Механические характеристики композиционных плёнок полиимид-графен

Наименование образца	Прочность при растяжении σ_p , МПа	Модуль упругости E , ГПа	Деформация до разрушения ε_p , %
Полиимид	95 ± 3	$1,82 \pm 0,17$	$46,8 \pm 3,4$
Полиимид-0,5 мас.% графена	72 ± 3	$2,2 \pm 0,19$	$37,9 \pm 4,1$
Полиимид-1 мас.% графена	62 ± 4	$3,07 \pm 0,21$	$33,1 \pm 4,4$
Полиимид-3 мас.% графена	42 ± 7	$5,15 \pm 0,62$	$9,4 \pm 2,2$

При этом σ_p и ε_p снижались. Для плёнок, содержащих 0,5 - 1 мас.% графена, σ_p составляла 62 - 73 МПа, а ε_p находилась в диапазоне 33 - 38 %. Несмотря на снижение по сравнению с ненаполненным полиимидом, эти значения остаются достаточно высокими для использования плёнок в качестве гибких токопроводящих элементов, поскольку образцы сохраняют целостность и могут подвергаться механическим манипуляциям как в сухом состоянии, так и в жидкой среде.

Характерные диаграммы «напряжение-деформация» плёнок с различным содержанием графена представлены на рисунке 3.2. Для каждого состава показана одна кривая, выбранная из серии десяти испытаний.

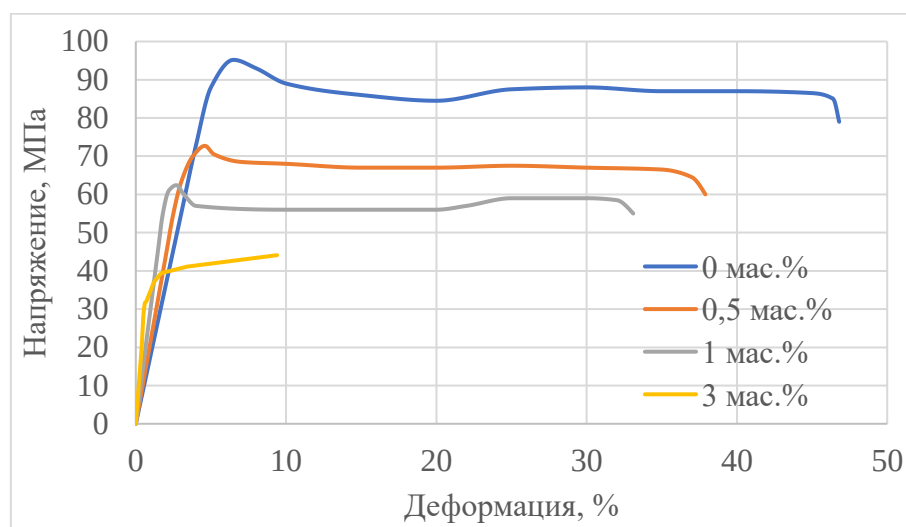


Рисунок 3.2 – Характерные диаграммы «напряжение–деформация» плёнок на основе полиимида Р-ОДФО с различным содержанием графена

Наиболее выраженное изменение механических характеристик наблюдалось при содержании 3 мас.% графена. Модуль упругости увеличивался до $5,15 \pm 0,62$ ГПа, тогда как прочность при разрыве снижалась до 42 ± 7 МПа, а относительная деформация при разрыве до 9,2,2 %. Снижение прочности и деформации при разрыве может быть связано с образованием локальных агрегатов графена. Такие участки выступают концентраторами напряжений и способствуют более раннему разрушению образца при растяжении.

При увеличении содержания графена от 0,5 до 3 мас.% модуль упругости полиимидных плёнок возрастал с $2,20 \pm 0,19$ до $5,15 \pm 0,62$ ГПа. Одновременно прочность при разрыве снижалась с 73 до 42 МПа, а относительная деформация при разрыве с 38 до 9,4 %. При 3 мас.% графена снижение этих характеристик становилось значительно более выраженным.

Введение углеродных наполнителей по-разному влияло на механические свойства исследованных матриц. Добавление ОСУНТ к хитозану в количестве до 0,5 мас.% сопровождалось одновременным увеличением прочности и

относительной деформации при разрыве. В полиимидной матрице введение графена повышало модуль упругости, но снижало прочность и относительную деформацию при разрыве во всём исследованном диапазоне концентраций. С точки зрения механических характеристик для полиимидных композитов предпочтителен диапазон 0,5 – 1 мас.% графена. Окончательный выбор состава требует сопоставления этих данных с электрическими и биологическими характеристиками материалов. Различие механического отклика связано с особенностями взаимодействия наполнителей с полимерными матрицами и характером их распределения в объёме материала.

3.2 Структура композиционных плёнок

Для оценки морфологии и внутренней структуры полученных плёночных материалов была проведена серия исследований методом сканирующей электронной микроскопии. Анализировали поверхности криосколов, полученных после разрушения образцов в жидком азоте. Такой подход позволил оценить плотность упаковки полимерной матрицы, характер излома, наличие дефектов, а также особенности распределения углеродного наполнителя в объёме плёнки. Снимки были получены при увеличении, соответствующем масштабной линейке 1 мкм.

На микрофотографии ненаполненной хитозановой плёнки (Рисунок 3.3, А) видна достаточно плотная слоистая структура с неоднородным рельефом поверхности скола. Излом имеет сглаженный характер без выраженных протяжённых нитевидных включений, что соответствует структуре исходной полисахаридной матрицы.

Введение 0,5 мас.% ОСУНТ приводит к изменению морфологии скола (Рисунок 3.3, Б). Структура становится более компактной и однородной, без заметного выделения отдельных крупных агрегатов наполнителя. Вероятно, при данной концентрации нанотрубки преимущественно распределены в объёме хитозановой матрицы и не образуют выраженной разрыхлённой сетки на поверхности излома. Это согласуется с результатами механических испытаний, где

для состава с 0,5 мас.% ОСУНТ наблюдалось наиболее благоприятное сочетание прочности и деформации до разрушения.

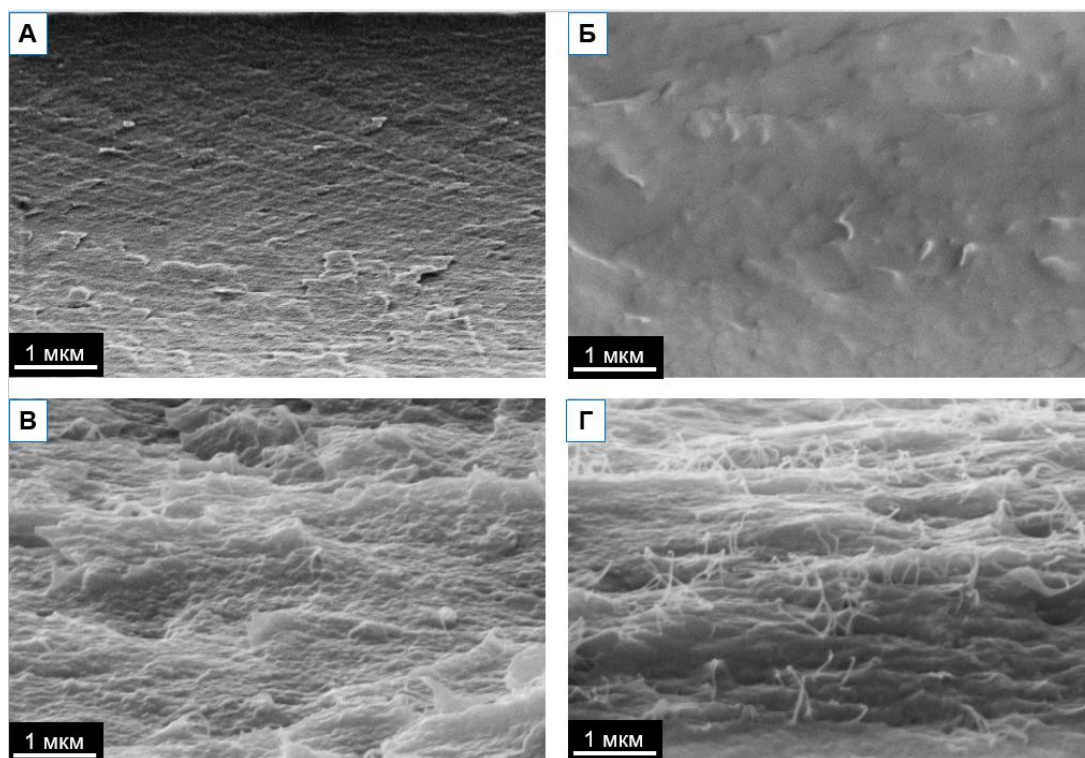


Рисунок 3.3 – Микрофотографии сколов в жидком азоте хитозановой плёнки (А) и композитных плёнок, содержащих 0,5; 1; 3 мас.% ОСУНТ (Б, В, Г)

При увеличении содержания ОСУНТ до 1 мас.% поверхность криоскола становится более рельефной (Рисунок 3.3, В). На изображении появляются отдельные нитевидные элементы и участки с более выраженной неоднородностью, которые можно связать с выходом углеродных нанотрубок или их пучков на поверхность скола. Такая морфология указывает на начало формирования более развитой структуры наполнителя в полимерной матрице.

Наиболее выраженные изменения наблюдаются для композита, содержащего 3 мас.% ОСУНТ (Рисунок 3.3, Г). В этом случае на поверхности излома отчётливо видны многочисленные нитевидные структуры, расположенные как вдоль плоскости плёнки, так и под углом к ней. Это свидетельствует о насыщении хитозановой матрицы углеродным наполнителем и формировании протяжённой сетки ОСУНТ. Такая структура должна способствовать образованию проводящих

путей и повышению электропроводности композита. Вместе с тем увеличение количества наполнителя может приводить к локальной агрегации нанотрубок и появлению участков неоднородности, что согласуется со снижением деформации до разрушения при высоких концентрациях ОСУНТ.

На микрофотографиях, представленных на рисунке 3.4, показаны поверхности криосколов композитов полиимид-графен. Для ненаполненного полиимида характерна плотная, достаточно однородная и слоистая структура излома (Рисунок 3.4, А). Поверхность скола имеет сглаженный характер, без выраженных пор, разрывов и крупных структурных неоднородностей. Такая морфология соответствует плотной упаковке полиимидной матрицы и согласуется с относительно высокой прочностью и деформационной способностью ненаполненной плёнки.

Введение графена приводит к заметному изменению характера излома. Уже при содержании 0,5 мас.% графена структура становится более рыхлой и неоднородной (Рисунок 3.4, Б), появляются пористые области, разрывы и складчатые пластинчатые фрагменты. Это указывает на нарушение исходной плотной слоистой структуры полиимида при введении дисперсного углеродного наполнителя.

При увеличении содержания графена до 1 мас.% неоднородность криоскола возрастает (Рисунок 3.4, В). На поверхности видны более выраженные пластинчатые элементы, выступы и участки с развитым рельефом. Вероятно, такие области связаны с присутствием графеновых частиц и их локальных скоплений в объёме полиимидной матрицы. Подобная морфология может способствовать формированию контактирующих углеродных доменов, необходимых для переноса заряда.

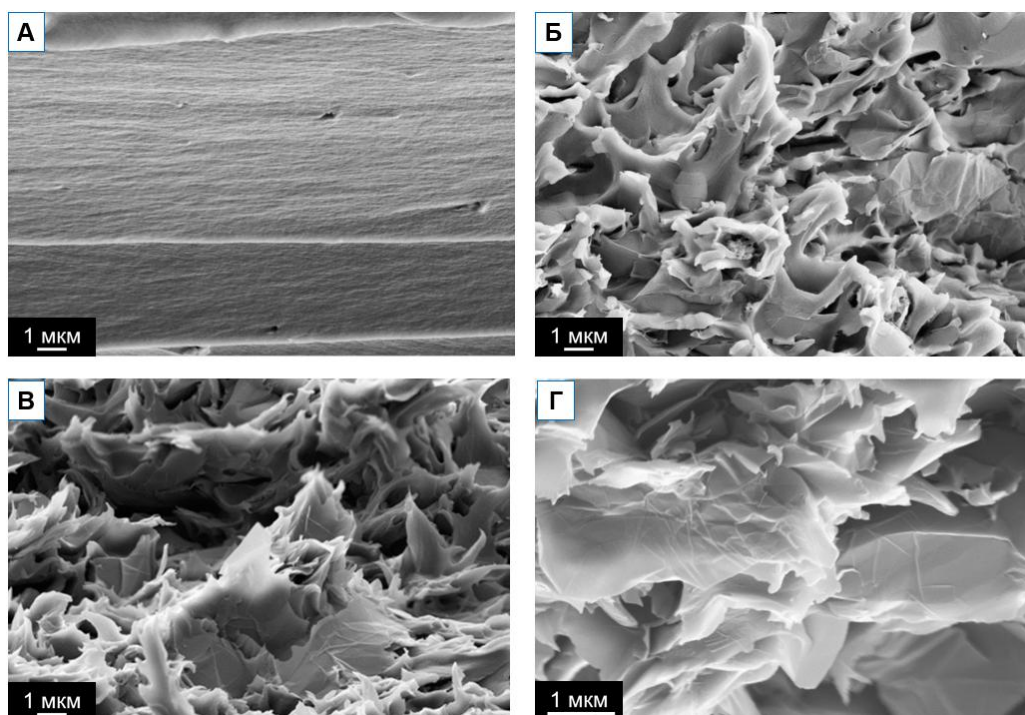


Рисунок 3.4 – Микрофотографии сколов в жидком азоте полиимидной плёнки (А) и композитных плёнок, содержащих 0,5; 1; 3 мас.% графена (Б, В, Г)

Наиболее выраженная перестройка структуры наблюдается для композита с 3 мас.% графена (Рисунок 3.4, Г). Поверхность излома представлена крупными пластинчатыми фрагментами, между которыми заметны тонкие перемычки и участки локальной агрегации наполнителя. Такая структура указывает на значительное разрыхление полиимидной матрицы и образование протяжённых областей, обогащённых графеном. Эти особенности создают предпосылки для формирования проводящих путей в объёме композита, что согласуется с увеличением электропроводности при росте концентрации графена.

Выявленные морфологические изменения хорошо согласуются с результатами механических испытаний. С одной стороны, введение графена повышает модуль упругости плёнок за счёт присутствия жёсткой углеродной фазы. С другой стороны, появление пористых областей, пластинчатых включений и локальных скоплений наполнителя может приводить к концентрации напряжений на границе раздела «матрица-наполнитель». Поэтому, при повышении содержания графена прочность и особенно деформация до разрушения снижаются.

СЭМ-изображения показали, что введение графена изменяет морфологию полиимидных плёнок. По мере увеличения содержания наполнителя на поверхности сколов становились более заметными пластинчатые включения и неоднородности рельефа. Наиболее выраженные изменения наблюдались при 3 мас.% графена, когда появлялись локальные агрегаты наполнителя. Такие агрегаты могут выступать концентраторами напряжений, что согласуется с установленным ранее снижением прочности и относительной деформации при разрыве.

3.3 Исследование топографии поверхности композиционных плёночных материалов методом атомно-силовой микроскопии

3.3.1 Топография поверхности плёнок хитозана-ОСУНТ

Проведенные исследования топографии поверхности методом АСМ показали изменение морфологии хитозановых плёнок, наполненных углеродными нанотрубками. Для образцов получены изображения топографии поверхности, а также на рисунках приведены гистограммы распределения элементов структуры по длине и ширине.

На основе данных АСМ можно отметить существенные различия в топографии поверхности ненаполненной хитозановой плёнки и композитной с содержанием ОСУНТ (Рисунок 3.5). Поверхность ненаполненной плёнки характеризуется относительной ровностью и однородностью рельефа, перепад высот составляет не более 5-10 нм. Такая плёнка имеет сглаженную волнообразную структуру без выраженных выступов и углублений, что ограничивает количество доступных сайтов адгезии для клеток.

Добавление ОСУНТ приводит к формированию развитого микрорельефа с характерными выступами и углублениями, а также к увеличению максимальных перепадов высот до десятков нанометров. В структуре поверхности появляются выраженные неоднородности, связанные с агрегацией и частичным упорядочиванием нанотрубок, формирующих перколяционные кластеры. Такая нанотопография существенно увеличивает площадь контакта и способствует более прочной адгезии клеток к субстрату. Кроме того, выраженный рельеф поверхности

индуцирует особенности поляризации клеток, что может проявляться в их вытягивании вдоль микроразмерных деталей рельефа поверхности.

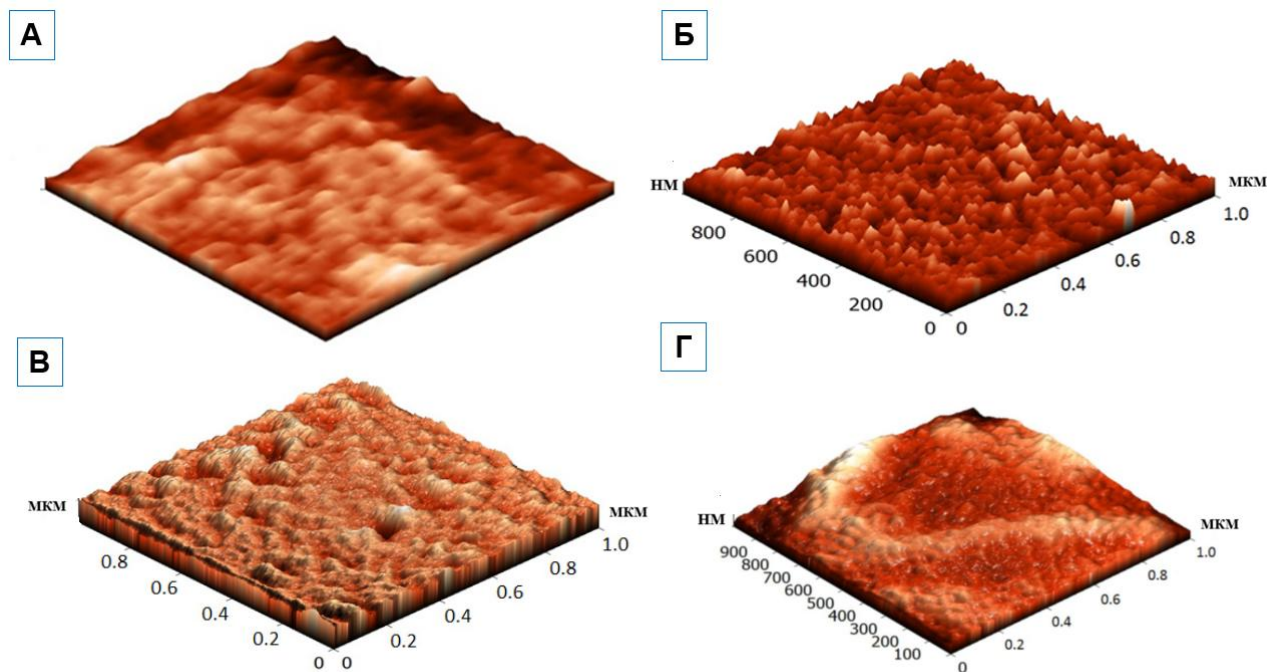


Рисунок 3.5 – 3D-изображение поверхности хитозановой плёнки (А) и композитных плёнок, содержащих 0,5; 1; 3 мас.% ОСУНТ (Б, В, Г). Размеры исследуемых поверхностей составляли 1х1 мкм

На рисунке 3.6 представлены двумерные АСМ-изображения поверхности композитных плёнок хитозан-ОСУНТ и гистограммы распределения структурных элементов рельефа по длине и ширине. Введение ОСУНТ приводит к формированию наноструктурированной поверхности с вытянутыми элементами, ориентированными преимущественно в плоскости плёнки. При содержании 0,5 мас.% ОСУНТ рельеф выглядит наиболее однородным, а распределение размеров элементов – более узким. При 0,1 и 3 мас.% ОСУНТ наблюдается больший разброс размеров, причём при 3 мас.% поверхность становится более неоднородной. Размер элементов рельефа по ширине преимущественно находился в диапазоне 5 – 50 нм. Полученные данные показывают, что содержание ОСУНТ влияет на размер и распределение этих элементов, а также на выраженность рельефа поверхности хитозановых плёнок.

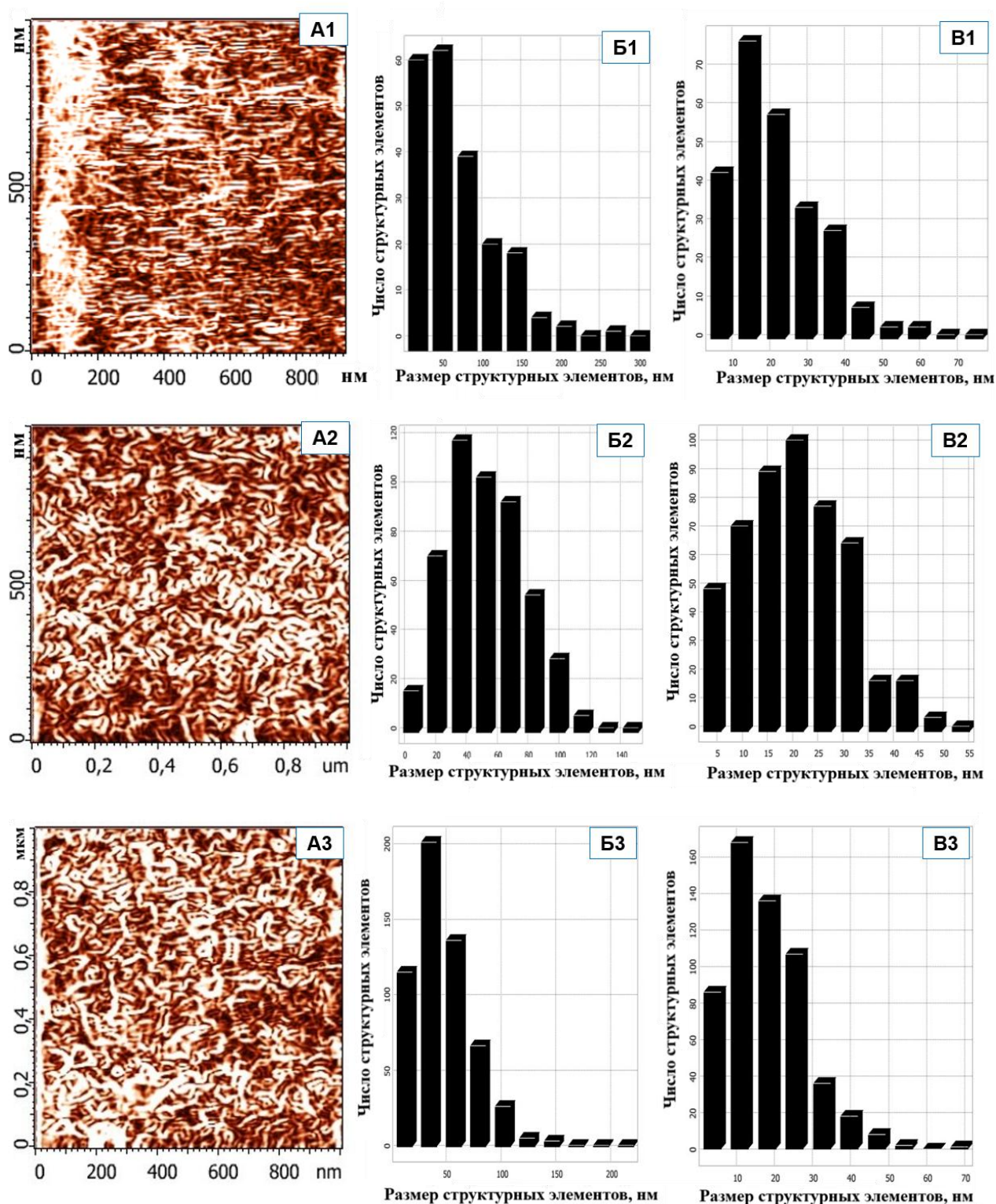


Рисунок 3.6 – АСМ-изображения поверхности композитных плёнок хитозан-ОСУНТ и распределение структурных элементов рельефа по размерам: А – двумерные изображения поверхности; Б – распределение по длине; В – распределение по ширине. Содержание ОСУНТ: 1 – 0,1 мас.%; 2 – 0,5 мас.%; 3 – 3 мас.%

По результатам атомно-силовой микроскопии рассчитан максимальный перепад высот (R_z) поверхности композитных плёнок на основе хитозана с различным содержанием ОСУНТ (Таблица 3.3). Ненаполненный хитозан характеризуется минимальной шероховатостью поверхности ($R_z \approx 20$ нм). Поверхность относительно гладкая, что типично для плёнок полисахаридной природы. При введении 0,1 мас.% ОСУНТ наблюдается двукратное увеличение R_z (≈ 40 нм), что можно связать с формированием начальных агрегатов углеродных нанотрубок. Существенный рост шероховатости происходит уже при 0,5 мас.% ОСУНТ ($R_z \approx 140$ нм). Это указывает на развитие рельефа поверхности за счёт образования кластеров нанотрубок и локальной гетерогенности распределения наполнителя. При 1 мас.% ОСУНТ значение R_z несколько снижалось и составляло около 120 нм. Это может быть связано с более равномерным распределением нанотрубок и их частичным погружением в полимерную матрицу при формировании плёнки, что уменьшает перепады высоты на поверхности. При увеличении содержания ОСУНТ до 3 мас.% значение R_z возрастало примерно до 280 нм. При такой концентрации увеличивается вероятность контакта нанотрубок и их объединения в агрегаты под действием межчастичных взаимодействий. Выход этих агрегатов к поверхности приводит к появлению более выраженных выступов и впадин.

Таблица 3.3 – Максимальный перепад высот (R_z) по 10 точкам поверхности матриц на основе хитозана и ОСУНТ и погрешность измерения (СКО), рассчитанные по данным АСМ

Образец	R_z , нм	СКО, нм
Хитозан	20	5
Хитозан-0,1 мас.% ОСУНТ	40	5
Хитозан-0,5 мас.% ОСУНТ	140	25
Хитозан-1 мас.% ОСУНТ	120	20
Хитозан-3 мас.% ОСУНТ	280	45

Введение ОСУНТ изменяло морфологию поверхности хитозановых плёнок. Ширина отдельных элементов рельефа преимущественно составляла 5 – 50 нм, тогда как перепады высоты достигали сотен нанометров. Наиболее выраженные изменения наблюдались при 3 мас.% ОСУНТ, когда значение R_z возрастало примерно до 280 нм и на поверхности появлялись локальные агрегаты наполнителя.

Топография поверхности может влиять на адгезию и распластывание клеток за счёт изменения площади контакта и расположения участков прикрепления [172, 173]. Однако универсального значения R_z , отделяющего благоприятный рельеф от неблагоприятного, не установлено. Клеточный ответ зависит не только от высоты неровностей, но и от их размера, формы, распределения и химического состава поверхности. Поэтому влияние выявленных изменений рельефа оценивали далее в экспериментах с клеточными культурами.

3.3.2 Топография поверхности плёнок полиимида Р-ОДФО и графена

Методом АСМ были изучены морфологические особенности поверхности ненаполненной плёнки полиимида Р-ОДФО и композитной плёнки полиимид-3 мас.% графена. Топографические изображения представлены на рисунке 3.7.

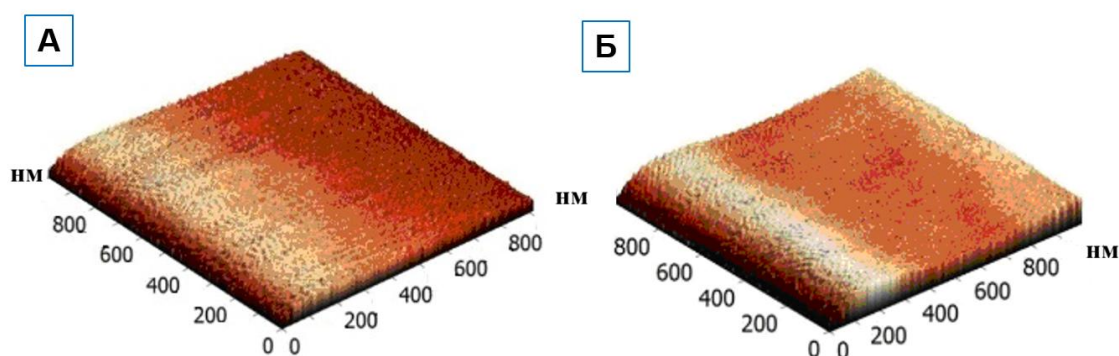


Рисунок 3.7 – 3D-изображение поверхности полиимидной плёнки (А) и композитной плёнки, содержащей 3 мас.% графена (Б). Размер исследуемых поверхностей 1x1 мкм

Поверхность ненаполненного полиимида характеризуется относительно сглаженным и однородным рельефом без резких локальных выступов и углублений

(Рисунок 3.7, А). Перепады высот на исследуемом участке выражены слабо, что соответствует плотной и достаточно равномерной поверхности полимерной плёнки.

Введение 3 мас.% графена приводит к изменению топографии поверхности (Рисунок 3.7, Б). Рельеф становится более выраженным, появляются участки с повышенной амплитудой высотных колебаний и менее равномерным распределением поверхностных элементов. Это может быть связано с присутствием графеновых частиц в поверхностном слое композита и их влиянием на упаковку полиимидной матрицы. При этом поверхность остаётся относительно сглаженной, без признаков крупных агломератов или резкой микромасштабной неоднородности.

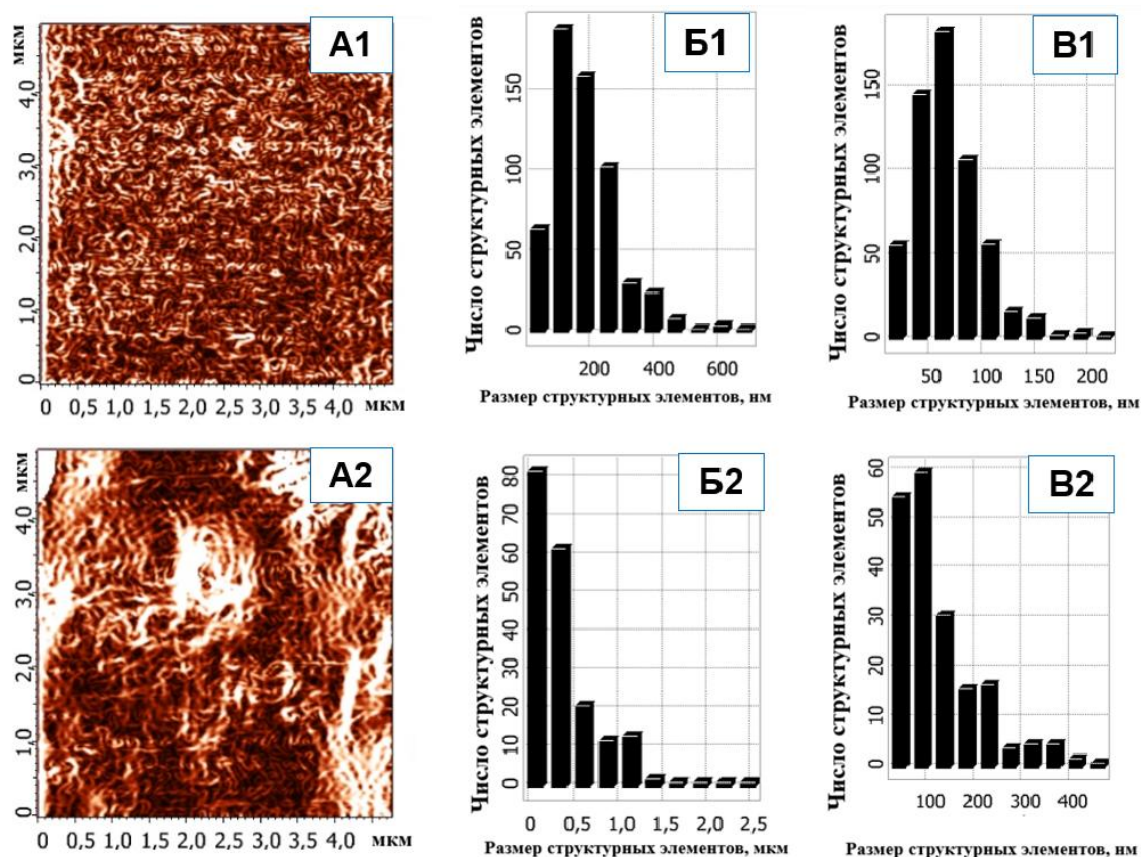


Рисунок 3.8 – АСМ-изображения поверхности композитных плёнок полиимид-графен и распределение структурных элементов рельефа по размерам: А – двумерные изображения поверхности; Б – распределение по длине; В – распределение по ширине. Содержание графена: 1 – 0 мас.%; 2 – 3 мас.%

На рисунке 3.8 представлены двумерные АСМ-изображения поверхности исследуемых образцов и гистограммы распределения структурных элементов рельефа по длине и ширине. Для ненаполненного полиимида основная часть элементов сосредоточена в области малых размеров, что соответствует относительно равномерной поверхности.

Для композита полиимид-3 мас.% графена распределение становится более широким, увеличивается доля протяжённых элементов, максимальный размер структурных элементов при введении в матричный полимер углеродных частиц составляет 2,5 мкм. Распределение по ширине также смещается в сторону более крупных значений. Это показывает, что введение графена приводит не только к увеличению высотных перепадов, но и к укрупнению латеральных элементов рельефа поверхности.

По данным атомно-силовой микроскопии установлено, что при введении 3 мас.% графена в полиимидную матрицу максимальный перепад высот R_z возрастает почти в два раза – с 130 до 250 нм (таблица 3.4). Это указывает на формирование более выраженного рельефа поверхности. Вероятно, такие изменения связаны с присутствием графеновых частиц в поверхностном слое композита и их влиянием на упаковку полиимидной матрицы.

Таблица 3.4 – Максимальный перепад высот (R_z) по 10 точкам поверхности матриц на основе полиимида и частиц графена и погрешность измерения (СКО), рассчитанные по данным АСМ

Образец	R_z , нм	СКО, нм
Полиимид	130	35
Полиимид-3 мас.% графена	250	50

Сопоставление двух типов композитов показывает, что при высоком содержании углеродного наполнителя значения R_z для хитозан-ОСУНТ и полиимид-графеновых плёнок находятся в близком диапазоне – около 250 – 280 нм.

Однако, характер изменения поверхности различается. В хитозановой матрице рост шероховатости связан преимущественно с формированием выраженных выступов и локальных скоплений нанотрубок, тогда как для полиимида с графеном наблюдается более равномерное усиление рельефа и укрупнение латеральных структурных элементов. Таким образом, можно заключить, что хитозановые плёнки более чувствительны к изменению содержания углеродного наполнителя, тогда как в полиимидной матрице влияние графена на топографию выражено мягче, но остаётся значимым.

3.4 Анализ химического состава поверхности композиционных плёнок

Метод РФЭС использовали для анализа химического состава поверхности хитозановой плёнки и оценки его изменения, возникающих при введении ОСУНТ. На рисунке 3.7 представлены C1s РФЭ-спектры ненаполненного хитозана и композиционных плёнок с различным содержанием углеродных нанотрубок.

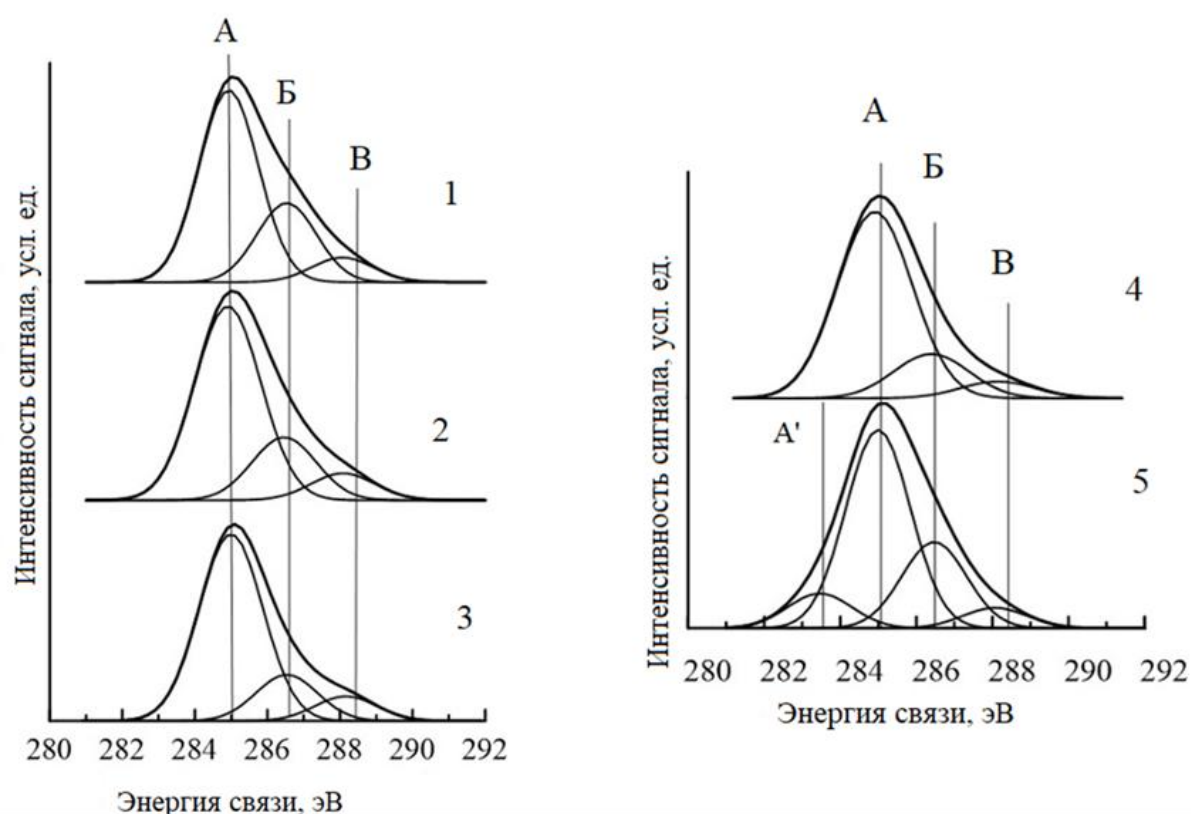


Рисунок 3.9 – C1s РФЭ-спектры поверхности плёнок в области C1s:

1 – ненаполненный хитозан, 2 – хитозан-0,1 мас.% ОСУНТ, 3 – хитозан-0,5 мас.% ОСУНТ, 4 – хитозан-1 мас.% ОСУНТ, 5 – хитозан-3 мас.% ОСУНТ

Спектр ненаполненного хитозана (Рисунок 3.7, образец 1) включает три характерные составляющие:

- пик А при $285,0 \pm 0,2$ эВ, соответствующий связям С–Н;
- пик Б при $286,4 \pm 0,2$ эВ, соответствующий связям С–С;
- пик В при $288,4 \pm 0,2$ эВ, связанный с функциональными группами С–О–Н и С–О–О–Н, характерными для полисахаридной структуры хитозана.

Для композиционных плёнок с содержанием ОСУНТ 0,1 – 1 мас.% форма $C1s$ -спектров в целом близка к спектру ненаполненного хитозана. Это указывает на то, что при малых концентрациях нанотрубок химическое состояние поверхностного слоя преимущественно определяется хитозановой матрицей, а вклад углеродного наполнителя в поверхностный спектр выражен слабо.

С увеличением содержания ОСУНТ до 3 мас.% (образец 5) в спектре $C1s$ появляется дополнительная составляющая А' с энергией связи $283,4 \pm 0,2$ эВ. Её появление может быть связано с вкладом углеродного наполнителя в спектр приповерхностного слоя композитной плёнки.

Данные РФЭС показали, что при содержании ОСУНТ 0,1 – 1 мас.% спектры $C1s$ композитных плёнок оставались близкими к спектру исходного хитозана. При увеличении содержания ОСУНТ до 3 мас.% в спектре появлялась дополнительная составляющая, связанная с присутствием углеродных наноструктур. Это указывает на увеличение доли ОСУНТ в поверхностном слое плёнки. Присутствие нанотрубок на поверхности может влиять на взаимодействие материала с клетками, включая их адгезию и распластывание [174]. Направленность этого влияния оценивали далее в экспериментах с клеточными культурами.

С помощью РФЭС также был исследован химический состав поверхности композитной плёнки на основе полиимида Р-ОДФО, содержащей 3 мас.% графена. Анализ проводили для исходного образца при 25 °С и после термообработки при

100 °С. На рисунке 3.8 представлены C1s РФЭ-спектры поверхности исследуемого композита.

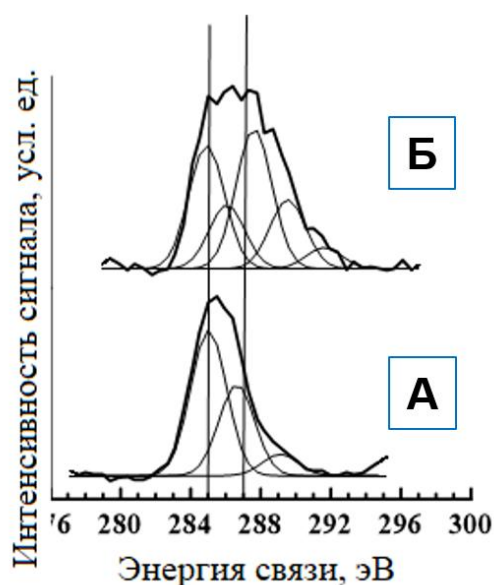


Рисунок 3.10 – C1s РФЭ-спектры поверхности композитной плёнки полиимид-3 мас.% графена: А – исходный образец при 25 °С; Б – образец после термообработки при 100 °С

Спектр образца при 25 °С включает несколько составляющих:

- пик в области 285 эВ, можно отнести к связям С–С/С–Н ароматических фрагментов полиимида и углеродной фазы графена;
- пики в диапазоне 286 – 290 эВ, относящиеся к связям С–О и О–С=О.

После нагревания образца до 100 °С общая форма спектра C 1s сохранялась, однако наблюдались небольшие изменения соотношения отдельных составляющих. Поскольку при получении плёнки проводили термическую обработку при 360 °С, эти различия вряд ли связаны с изменением структуры полиимидной матрицы. Более вероятной причиной является удаление с поверхности адсорбированной воды, остаточных низкомолекулярных соединений и других компонентов, способных десорбироваться при нагревании.

РФЭС-анализ показывает, что композит полиимид-3 мас.% графена сохраняет основные химические признаки полиимидной матрицы после термообработки при 100 °С. Существенных изменений, указывающих на разрушение поверхностной структуры материала, не выявлено. Это свидетельствует о термической стабильности композита в данных условиях и подтверждает возможность его стерилизации при повышенной температуре без выраженного изменения химического состава поверхности.

3.5 Гидрофильность композиционных плёнок

Исследование гидрофильности методом измерения краевого угла смачивания показало, что исходная плёнка на основе хитозана имеет угол смачивания 69 °С, что соответствует умеренно гидрофильной поверхности. Введение ОСУНТ в концентрациях от 0,1 до 3 мас.% не приводило к существенному изменению данного показателя. Значения угла смачивания находились в диапазоне 67 – 70 °С (Таблица 3.5). Следовательно, добавление углеродных нанотрубок практически не изменяет гидрофильность хитозановой поверхности.

Таблица 3.5 – Угол смачивания водой поверхности исследованных плёнок на основе хитозана и ОСУНТ

Образец	Угол смачивания, град.
Хитозан	69 ± 1
Хитозан-0,1 мас.% ОСУНТ	69 ± 1
Хитозан-0,5 мас.% ОСУНТ	70 ± 2
Хитозан-1 мас.% ОСУНТ	68 ± 1
Хитозан-3 мас.% ОСУНТ	67 ± 1

Сохранение умеренной гидрофильности является важным для биомедицинского применения таких материалов, поскольку начальное взаимодействие клеток с матрицей определяется не только химическим составом, но и смачиваемостью поверхности, адсорбцией белков и микрорельефом. В данном

случае композиты хитозан-ОСУНТ сохраняют способность к взаимодействию с водной средой, что создаёт благоприятные условия для последующей адгезии и роста клеток [175].

Аналогичные измерения были проведены для плёнок на основе полиимида Р-ОДФО и графена. Как видно из таблицы 3.6, угол смачивания этих материалов находится в диапазоне 65 – 73 °С. Введение графена до 3 мас.% несколько увеличивает угол смачивания, однако, все образцы остаются умеренно гидрофильными. Это указывает на то, что при использованных условиях получения композитов поверхность не обогащается графеном настолько, чтобы резко изменить поверхностную энергию материала.

Таблица 3.6 – Угол смачивания водой поверхности исследованных плёнок на основе полиимида и частиц графена

Образец	Угол смачивания, град.
Полиимид	65 ± 4
Полиимид-0,5 мас.% графена	69 ± 5
Полиимид-1 мас.% графена	72 ± 3
Полиимид-3 мас.% графена	73 ± 5

Поверхности с краевым углом смачивания водой в диапазоне 60-80 °С обычно благоприятны для адгезии и распластывания клеток. Для плёнок хитозан-ОСУНТ значения краевого угла составляли 67–70 °С, а для плёнок полиимид-графен 65-73 °С. Оба типа композитов находились в указанном диапазоне. Следовательно, смачиваемость их поверхности соответствует условиям, благоприятным для начального прикрепления клеток [176]. Фактический клеточный ответ на исследованные материалы оценивали в последующих экспериментах.

3.6 Электропроводность композиционных плёнок

Электропроводность композиционных плёнок исследовали для оценки влияния содержания углеродного наполнителя на перенос электрического заряда. В

дисперсных композитах проводимость определяется не только концентрацией наполнителя, но и расстоянием между его частицами, количеством межчастичных контактов и связностью углеродной фазы.

На рисунке 3.11 представлена зависимость удельной электропроводности плёнок хитозан-ОСУНТ от содержания углеродных нанотрубок. Электропроводность ненаполненного хитозана составляла $10^{-11} - 10^{-12}$ См/м. При введении 0,1 – 0,5 мас.% ОСУНТ она увеличивалась до $10^{-7} - 10^{-6}$ См/м, то есть на пять-шесть порядков. Такой рост показывает, что уже при малом содержании нанотрубок в матрице появляются участки переноса заряда, образованные близко расположенными частицами и отдельными контактами между ними.

При увеличении содержания ОСУНТ до 1 мас.% электропроводность достигала около 10^{-2} См/м. Это указывает на дальнейшее увеличение связности углеродной фазы и числа путей переноса заряда. При 3 мас.% ОСУНТ электропроводность возрастала до нескольких См/м. Нелинейный характер этого изменения связан с тем, что повышение концентрации нанотрубок не только увеличивает их количество, но и резко повышает вероятность межчастичных контактов, уменьшает расстояние между соседними ОСУНТ и создаёт дополнительные параллельные пути переноса заряда.

Полученная зависимость свидетельствует о постепенном формировании связной углеродной сети в широком диапазоне содержания ОСУНТ. Ограниченное число исследованных концентраций не позволяет точно определить положение перколяционного порога. Для этого необходимы дополнительные измерения с меньшим шагом по концентрации, особенно в области ниже 0,5 мас.%. Полученные результаты показывают, что электропроводность плёнок может изменяться на стадии изготовления за счёт выбора содержания ОСУНТ. Исследованные составы далее использовали для сопоставления электрических характеристик с механическими свойствами и клеточным ответом.

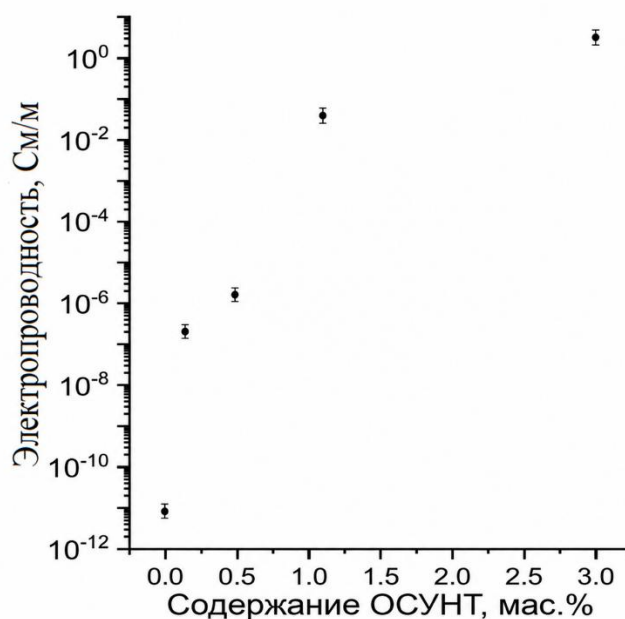


Рисунок 3.11 – Зависимость электропроводности композиционных плёнок хитозан-ОСУНТ от содержания углеродных нанотрубок

На рисунке 3.12 представлена зависимость электропроводности композитных плёнок полиимид-графен от содержания наполнителя. Электропроводность ненаполненного полиимида составляла около 10^{-15} См/м, что соответствует диэлектрическому характеру материала [177]. При введении 0,5 мас.% графена она возросла до 5×10^{-2} См/м. Это показывает, что при данной концентрации в полиимидной матрице уже сформированы связанные пути переноса заряда.

Резкое увеличение электропроводности между ненаполненным полиимидом и композитом с 0,5 мас.% графена позволяет отнести перколяционный переход к области малых концентраций наполнителя. В исследованном концентрационном ряду 0,5 мас.% является первой точкой, соответствующей сформированной проводящей сети, поэтому это значение можно рассматривать как верхнюю оценку перколяционного порога.

При увеличении содержания графена до 1 мас.% электропроводность достигала 5×10^{-1} См/м, а при 3 мас.% возросла до 10^2 См/м. Нелинейный рост проводимости связан с увеличением числа контактов между графеновыми пластинами и повышением связности углеродной фазы в объёме полиимидной

матрицы. Пластинчатая форма графена способствует формированию связанных проводящих участков при малом содержании наполнителя [177, 178].

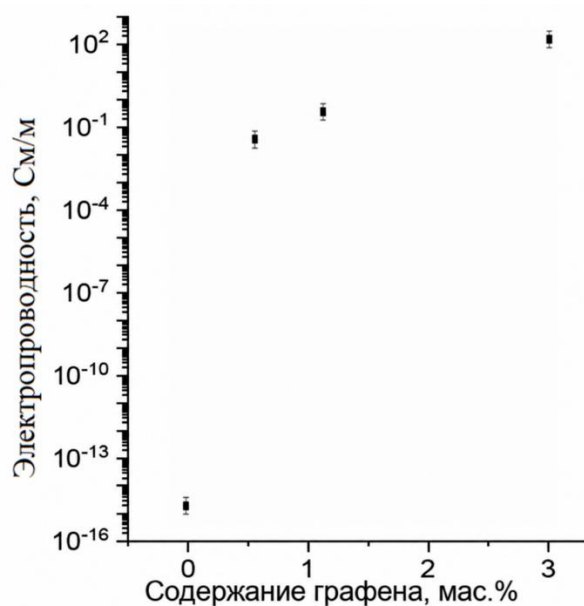


Рисунок 3.12 – Зависимость электропроводности композиционных плёнок полиимид-графен от содержания графена

Так, введение графена позволяет получать полиимидные композиты с заданной электропроводностью. В отличие от хитозановой системы, где резкий рост проводимости наблюдается в диапазоне 0,5 – 1 мас.% ОСУНТ, для полиимида с графеном перколяционный переход проявляется уже около 0,5 мас.% наполнителя.

3.7 Вольт-амперные характеристики плёночных композиционных материалов в сухом состоянии и в физиологическом растворе

3.7.1 Вольт-амперные характеристики плёнок хитозан-ОСУНТ

При проведении экспериментов по электростимуляции важно учитывать электрические свойства плёнок в условиях, максимально приближенных к клеточным испытаниям. Поэтому все измерения проводили в сконструированной тefлоновой ячейке для электростимуляции, использованной далее в экспериментах с клеточными культурами. Параметры подаваемого сигнала также соответствовали режиму электростимуляции клеток: на образцы подавали переменный

прямоугольный потенциал с амплитудой 100 мВ и сменой полярности каждые 30 с. Для оценки величины и характера токов, протекающих через плёночные матрицы в данной ячейке, исследовали образцы как в сухом состоянии при 22 °С и относительной влажности 40 – 60%, так и после погружения в физиологический раствор (ФР).

На рисунке 3.13 представлены вольтамперные характеристики сухих плёнок хитозан-ОСУНТ с содержанием углеродных нанотрубок 0; 0,5; 1 и 3 мас.%. Все зависимости имеют линейный характер, без выраженного насыщения по току. Это указывает на омическое поведение сухих образцов и преимущественно электронный характер переноса заряда в плёнках, содержащих проводящий наполнитель.

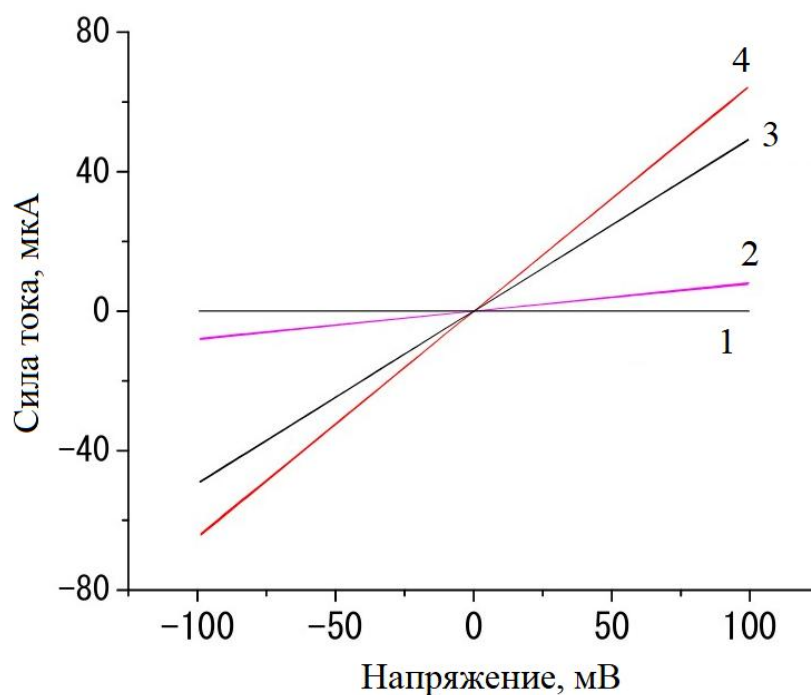


Рисунок 3.13 – Вольтамперные характеристики сухих образцов хитозан-ОСУНТ с разным содержанием ОСУНТ: 1 – 0 мас.%; 2 – 0,5 мас.%; 3 – 1 мас.%; 4 – 3 мас.%

С увеличением содержания ОСУНТ возрастает наклон вольт-амперных характеристик, что соответствует повышению проводимости материала. Для ненаполненного хитозана ток в выбранном диапазоне напряжений находился ниже

предела регистрации измерительной системы. При содержании 0,5 мас.% ОСУНТ регистрировался устойчивый токовый отклик. Следовательно, проводящие пути в композите формируются уже при этой концентрации наполнителя. Дальнейшее увеличение содержания ОСУНТ до 1 и 3 мас.% сопровождается постепенным ростом тока за счёт увеличения числа контактов между нанотрубками и развития проводящей сети в хитозановой матрице.

Для исследования электрических свойств в физиологических условиях плёнки полностью погружали в ячейку с физиологическим раствором. При набухании плёнок характер токового отклика изменялся [179]. В отличие от линейных зависимостей, полученных для сухих образцов, в физиологическом растворе на вольт-амперограммах наблюдались нелинейность и петля гистерезиса. Такое поведение связано с одновременным протеканием нескольких процессов: переносом заряда по сети ОСУНТ, движением ионов в гидратированной хитозановой матрице и поляризацией границ раздела.

В сухом хитозане подвижность ионов ограничена из-за недостатка воды, необходимой для образования гидратной среды и переноса протонов. При погружении в физиологический раствор матрица поглощает воду и набухает, а содержащиеся в растворе ионы получают возможность перемещаться внутри плёнки. Одновременно набухание увеличивает расстояния между отдельными ОСУНТ и может нарушать часть контактов в проводящей сети.

Для образца с 3 мас.% ОСУНТ ток при напряжении 100 мВ после погружения в физиологический раствор уменьшался примерно с 75 до 2,5 мкА. Следовательно, в данных условиях ослабление электронной проводимости вследствие набухания матрицы преобладало над вкладом возникающего ионного переноса. Дополнительное влияние оказывали поляризация границ раздела и образование двойного электрического слоя, на котором происходило частичное падение приложенного напряжения.

На рисунке 3.14 представлены циклические вольт-амперограммы плёнок хитозан-ОСУНТ, полностью погружённых в физиологический раствор. Для сравнения приведена вольт-амперограмма ячейки с физиологическим раствором

без плёнки. Площадь петли отражает ёмкостный вклад, связанный преимущественно с зарядом двойного электрического слоя на границах раздела. Наибольшая площадь петли наблюдалась для композита с 3 мас.% ОСУНТ, что свидетельствует о наиболее выраженном ёмкостном отклике среди исследованных составов. При уменьшении содержания нанотрубок этот вклад снижался.

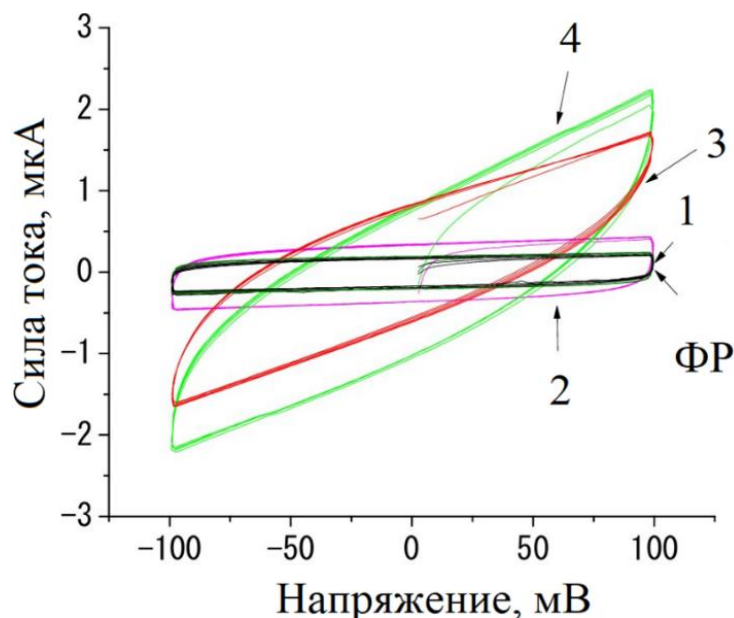


Рисунок 3.14 – Циклические вольт-амперограммы плёнок хитозан-ОСУНТ в физиологическом растворе с различным содержанием углеродных нанотрубок: 1 – 0 мас.%; 2 – 0,5 мас.%; 3 – 1 мас.%; 4 – 3 мас.%. Для сравнения приведена вольт-амперограмма ячейки с физиологическим раствором без плёнки, обозначенная как «ФР»

Для ненаполненного хитозана вольт-амперная характеристика близка к кривой ячейки с физиологическим раствором без плёнки. Следовательно, вклад самой плёнки в токовый отклик системы невелик, а регистрируемый ток определяется преимущественно переносом ионов в растворе и процессами на поверхности электродов. При увеличении содержания ОСУНТ от 0,5 до 1 мас.% ток возрастает примерно на порядок, с 0,25 до 2,5 мкА. Поскольку проводящие пути формируются уже при 0,5 мас.% ОСУНТ, наблюдаемое увеличение тока связано с ростом числа контактов между нанотрубками и дальнейшим развитием проводящей сети. Для композитов с 1 – 3 мас.% ОСУНТ токовый отклик

определяется совместным вкладом проводящей сети нанотрубок, переноса ионов в гидратированной хитозановой матрице и поляризации границ раздела.

3.7.2 Вольтамперные характеристики плёнок полиимид-графен

На рисунке 3.15 представлены вольтамперные характеристики плёнок полиимид-графен в диапазоне ± 100 мВ. Измерения проводили в сухом состоянии и после погружения образцов в физиологический раствор. Для сравнения также приведена характеристика ячейки с физиологическим раствором без плёнки [180].

Ненаполненная плёнка полиимида Р-ОДФО в сухом состоянии практически не проводит ток в исследуемом диапазоне напряжений, что соответствует диэлектрическому характеру исходной полимерной матрицы (Рисунок 3.15, А). При исследовании ненаполненного полиимида в физиологическом растворе электроды не были изолированы плёнкой от электролита. Поэтому регистрируемый ток проходил преимущественно через физиологический раствор между электродами, то есть в обход полиимидной плёнки. Его величина определялась переносом ионов в электролите и процессами на границах раздела «электрод–раствор». Близость полученной вольт-амперной характеристики к контрольной кривой ячейки с физиологическим раствором без плёнки подтверждает, что наблюдаемый ток не связан с ионной проводимостью полиимида.

Для сухих композитных образцов зависимости тока от приложенного напряжения имеют линейный характер, что указывает на преимущественно электронный механизм переноса заряда (Рисунок 3.15, Б-Г, кривые 1). С увеличением содержания графена ток через образец возрастает на несколько порядков. Это связано с развитием проводящей графеновой сети в объёме полиимидной матрицы.

Для образца полиимид-0,5 мас.% графена токи остаются низкими, а при погружении в физиологический раствор появляется выраженная петля циклической вольтамперограммы (Рисунок 3.15, Б). Это свидетельствует о значительном вкладе ионного переноса и ёмкостных процессов на границе раздела «плёнка–электролит». В данном случае электронная проводимость композита ещё недостаточна для доминирующего переноса заряда через объём материала, поэтому

заметную роль играет физиологический раствор и процессы формирования двойного электрического слоя.

Для плёнки полиимид-1 мас.% графена ток возрастает, а форма зависимости становится ближе к линейной (Рисунок 3.15, В). При этом в физиологическом растворе сохраняется отличие от сухого образца, что указывает на сочетание электронной проводимости графеновой сети и ионного вклада электролита. Такой характер поведения соответствует переходной области, где проводящая сеть уже формируется, но межфазные процессы ещё заметно влияют на общий токовый отклик.

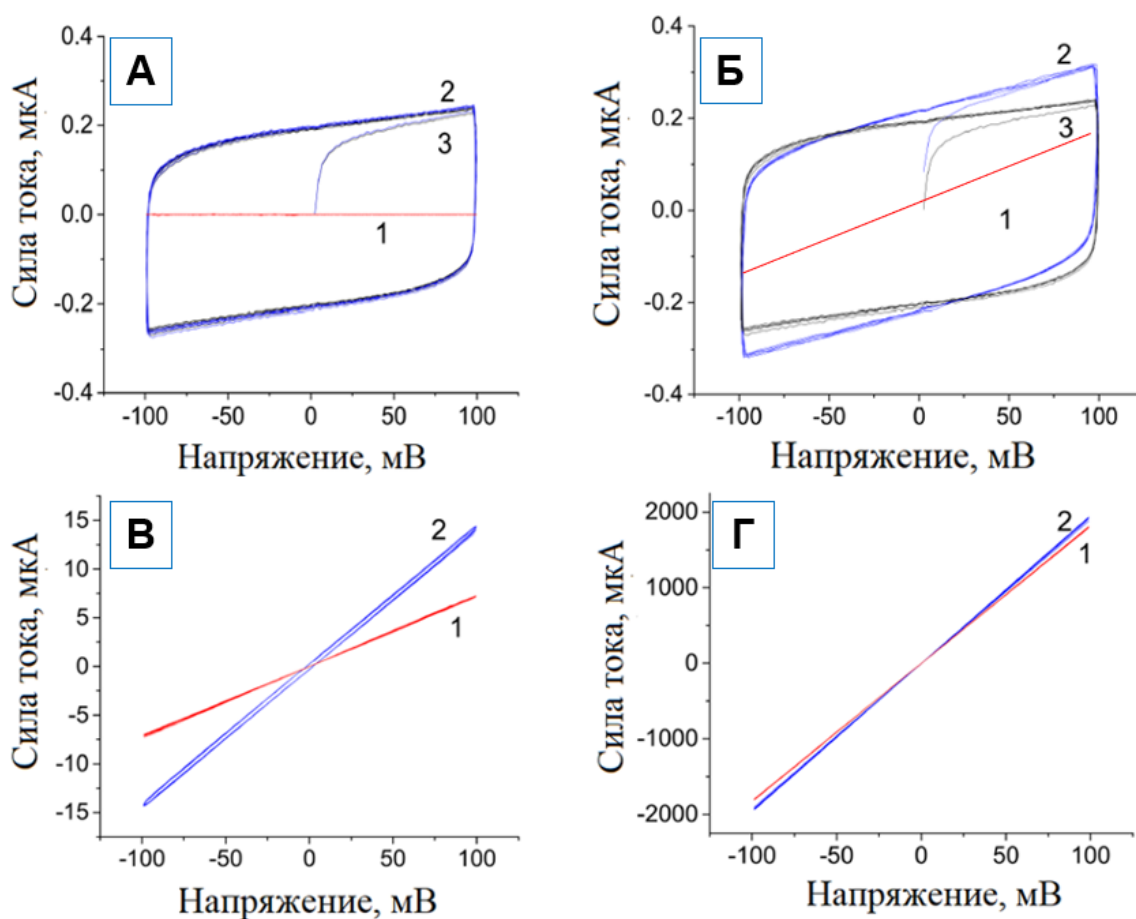


Рисунок 3.15 – Вольт-амперные характеристики ненаполненной полиимидной плёнки Р-ОДФО (а) и плёнок, содержащих 0,5 мас.% (б), 1 мас.% (в) и 3 мас.% (г) частиц графена: 1 – сухие образцы; 2 – образцы, погружённые в физиологический раствор (ФР); 3 – электроды в ФР без плёнки

Для образца полиимид-3 мас.% графена вольтамперные характеристики в сухом состоянии и в физиологическом растворе практически совпадают и имеют линейный вид (Рисунок 3.15, Г). Это показывает, что при данной концентрации наполнителя перенос заряда определяется главным образом электронной проводимостью по развитой графеновой сети. Вклад ионного транспорта в электролите становится менее существенным по сравнению с током, протекающим через объём композитной плёнки.

Результаты демонстрируют, что при увеличении содержания графена в полиимидной матрице происходит переход от диэлектрического поведения ненаполненного полиимида и преимущественно ионно-ёмкостного отклика в системе «плёнка-электролит» к электронному переносу заряда через графеновую проводящую сеть. Наиболее выраженная электронная проводимость наблюдается для полиимид-3 мас.% графена.

Важно отметить, что непрерывное циклирование потенциала на протяжении часов не вызывает снижения тока, протекающего и по сухой, и по влажной матрице. Электрохимические характеристики матриц также воспроизводятся после их длительного хранения при нормальных условиях в сухом состоянии и в физиологическом растворе. Это говорит о стабильности исследуемых материалов и возможности их долговременного хранения и многократного использования, что актуально применительно к клеточной терапии.

3.8 Исследование биосовместимости материалов *in vitro*

Биосовместимость полученных материалов оценивали методом МТТ-теста после культивирования дермальных фибробластов человека на поверхности плёночных матриц в течение 1 и 4 суток (Рисунок 3.16). В экспериментах использовали клетки не старше 12 пассажа.

На 1-е сутки значения оптической плотности на всех плёночных образцах оставались относительно низкими. Это связано с начальным этапом адаптации клеток к поверхности материала, их прикреплением и распластыванием. При этом резкого снижения МТТ-показателя, которое могло бы указывать на выраженное цитотоксическое действие, для композитов хитозан-ОСУНТ не наблюдалось.

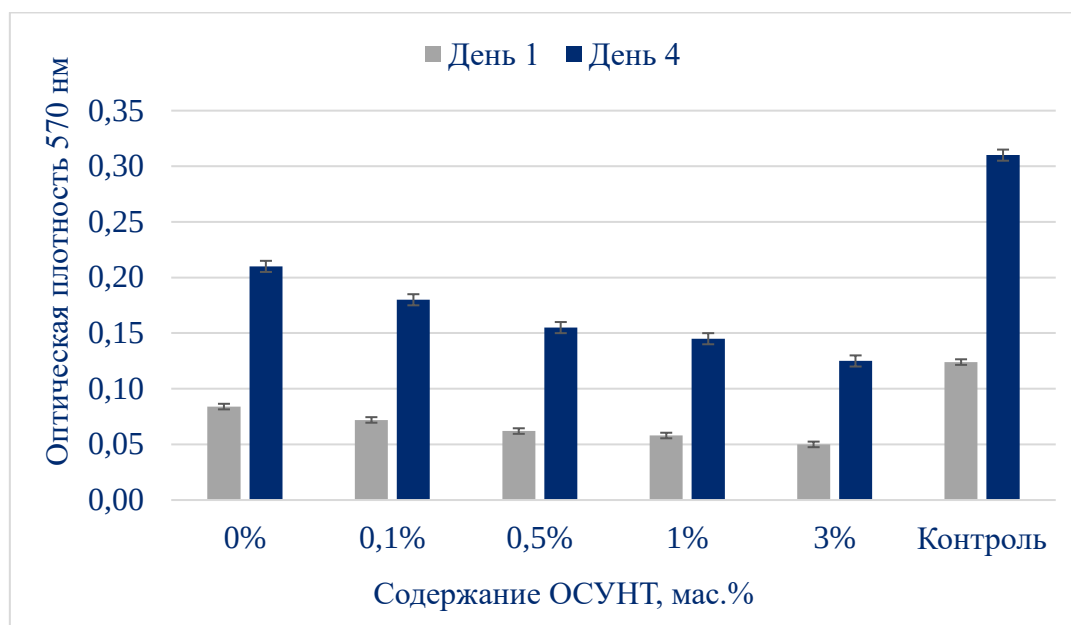


Рисунок 3.16 – Оценка биосовместимости плёнок хитозан-ОСУНТ методом МТТ-теста после культивирования дермальных фибробластов человека в течение 1 и 4 суток. Контроль – клетки, культивированные на поверхности культурального пластика

К 4-м суткам культивирования оптическая плотность увеличивалась на всех исследуемых образцах, что свидетельствует о сохранении жизнеспособности фибробластов и росте клеточной популяции. Наиболее высокие значения среди плёночных материалов наблюдались для ненаполненного хитозана. При введении ОСУНТ отмечалась тенденция к снижению МТТ-показателя по мере увеличения содержания наполнителя. Наименьшая метаболическая активность клеток среди композитных плёнок была зарегистрирована для образца хитозан-3 мас.% ОСУНТ.

На всех исследованных плёнках МТТ-сигнал увеличивался с 1-х по 4-е сутки, что свидетельствует о сохранении метаболической активности и росте числа клеток. Вместе с тем, при введении ОСУНТ значения МТТ-теста были ниже, чем для ненаполненного хитозана. Вместе с тем, увеличение содержания углеродных нанотрубок выше 1 мас.% может ограничивать пролиферацию фибробластов, что, вероятно, связано с изменением рельефа, состава и свойств поверхности композитной плёнки. Поэтому при выборе состава материала необходимо

учитывать не только достижение электропроводности, но и сохранение благоприятных условий для клеточной адгезии и роста.

Биосовместимость композитных плёнок полиимид-графен также оценивали методом МТТ-теста после культивирования дермальных фибробластов человека в течение 1 и 4 суток (Рисунок 3.17). На 1-е сутки значения оптической плотности для всех плёночных образцов находились на близком уровне, что соответствует начальному этапу прикрепления и адаптации клеток к поверхности материала.

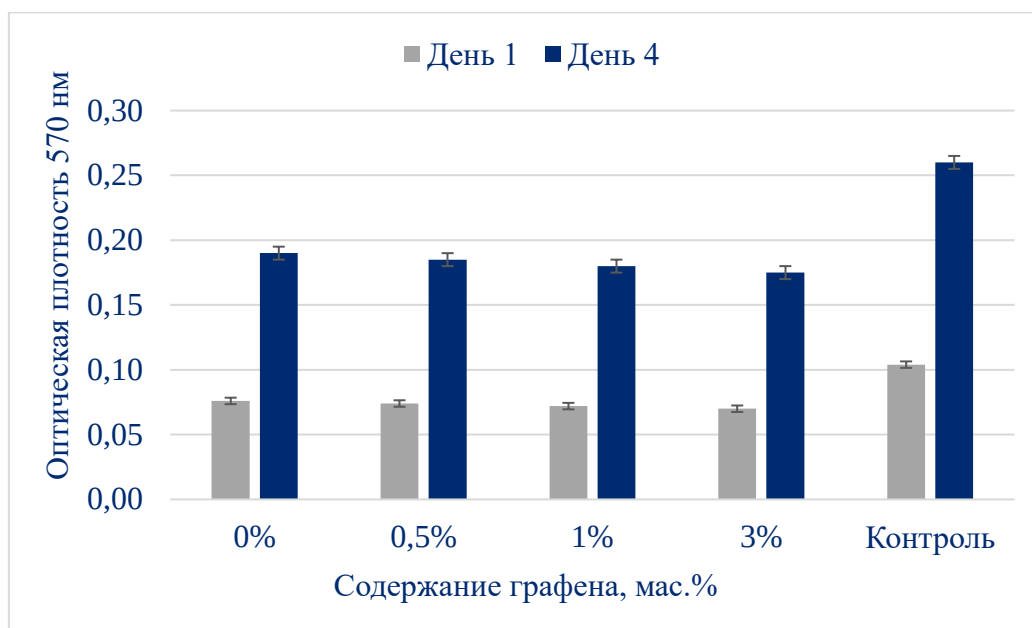


Рисунок 3.17 – Оценка биосовместимости плёнок полиимид-графен методом МТТ-теста после культивирования дермальных фибробластов человека в течение 1 и 4 суток. Контроль – клетки, культивированные на поверхности культурального пластика

К 4-м суткам культивирования на всех исследуемых плёнках наблюдалось увеличение оптической плотности при 570 нм, что указывает на рост количества метаболически активных фибробластов. Наиболее высокие значения среди плёночных материалов были получены для ненаполненного полиимида Р-ОДФО. При этом результаты для композитов с 0,5 – 3 мас.% графена были сопоставимы между собой и не демонстрировали выраженной зависимости от содержания наполнителя. Следовательно, в исследованном диапазоне концентраций графен не

оказывал существенного влияния на рост клеток, а их ответ определялся преимущественно свойствами полиимидной подложки.

Следует отметить, что значения МТТ-показателя на плёнках полиимид-графен были ниже, чем в контрольной группе на культуральном пластике. Это ожидаемо, поскольку культуральный пластик представляет собой специально обработанную поверхность, оптимизированную для клеточной адгезии. Тем не менее, рост оптической плотности с 1-х по 4-е сутки для всех композитных образцов подтверждает отсутствие выраженного цитотоксического действия и удовлетворительную биосовместимость плёнок полиимид-графен.

Результаты МТТ-теста показывают, что плёнки хитозан-ОСУНТ и плёнки полиимид-графен поддерживают жизнеспособность дермальных фибробластов человека. При этом увеличение содержания углеродного наполнителя может несколько снижать метаболическую активность клеток, что необходимо учитывать при выборе состава материала. В целом исследованные композиты обладают достаточной биосовместимостью и могут рассматриваться как плёночные матрицы для дальнейших экспериментов по электростимуляции клеток.

3.9 Влияние электростимуляции на динамику роста клеточных культур по данным RTCA

В данном разделе оценивали влияние однократной электростимуляции на последующую динамику роста клеточных культур. В отличие от экспериментов *in vivo*, где электростимуляцию проводили многократно в течение нескольких суток, в опытах *in vitro* клетки подвергали одному сеансу воздействия, после чего их переносили в планшет RTCA iCELLigence и регистрировали изменение клеточного индекса в течение последующего культивирования.

При анализе кривых RTCA основное внимание уделяли не конечной точке измерения, а различиям между контрольными и стимулированными группами в области максимального клеточного индекса и на участке активной пролиферации. Такой подход связан с особенностями метода. В течение всего периода регистрации клетки находятся в одной и той же лунке без пересадки, а площадь электродной поверхности ограничена. Поэтому по мере зарастания лунок клетками кривые

разных групп могут постепенно сближаться, даже если на ранних этапах одна из культур заметно отставала или, наоборот, росла быстрее. В этих условиях конечные значения CI не всегда отражают исходный эффект электростимуляции.

Более информативными показателями являются скорость восстановления клеток после воздействия, характер начальной адгезии, наклон кривой в фазе активного роста и максимальный уровень CI, достигаемый до выхода культуры на плато. Именно эти параметры использовали для сопоставления эффективности электростимуляции на разных типах плёночных матриц: хитозан-ОСУНТ, полиимид-графен и в комбинированной двухслойной системе с хитозановой плёнкой.

3.9.1 Электростимуляция клеток на поверхности композитных плёнок хитозан-ОСУНТ

На данном этапе исследовали влияние электростимуляции на дермальные фибробласты человека, культивируемые непосредственно на поверхности плёнок хитозан-ОСУНТ. Такой подход позволял оценить клеточный ответ при прямом контакте с проводящей матрицей и сопоставить его с электрофизическими характеристиками материала. На все образцы подавали одинаковый переменный прямоугольный потенциал с амплитудой 100 мВ и сменой полярности каждые 30 с, однако, величина протекающего тока зависела от состава плёнки и степени сформированности проводящей сети ОСУНТ.

Для ненаполненного хитозана пиковые значения тока составляли около $\pm 0,5$ мкА. Клеточный индекс в стимулированной группе увеличивался медленнее, чем в контрольной, особенно на начальном участке кривой (Рисунок 3.18, А). Следовательно, при выбранном режиме электростимуляция фибробластов на ненаполненной хитозановой плёнке не оказывала положительного влияния на клеточный ответ.

Для композита хитозан-1 мас.% ОСУНТ пиковый ток возрастал до ± 2 мкА. После начального отставания клеточный индекс стимулированной группы приближался к контрольному уровню (Рисунок 3.18, Б). Выраженного

положительного или отрицательного эффекта электростимуляции для этого состава не наблюдалось.

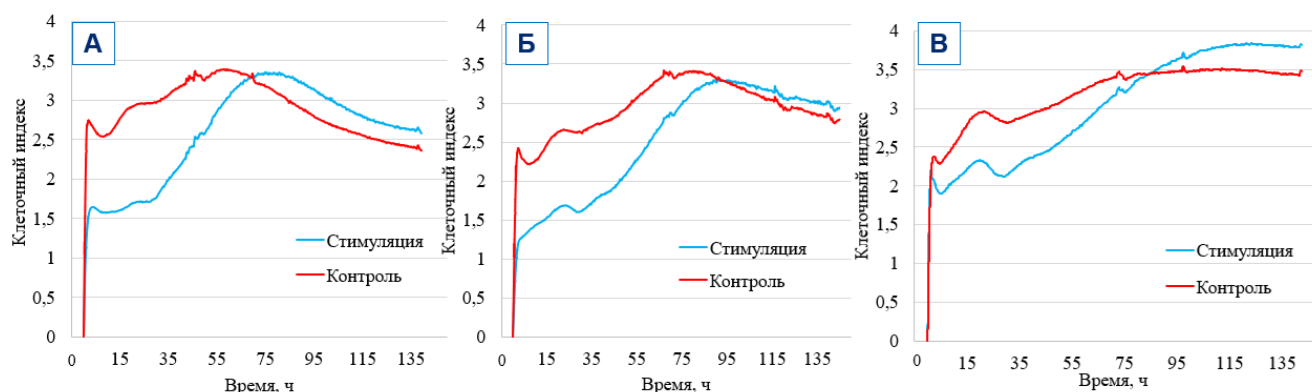


Рисунок 3.18 – Динамика клеточного роста дермальных фибробластов человека после электростимуляции на плёнках хитозан-ОСУНТ:

А – ненаполненный хитозан; Б – хитозан-1 мас.% ОСУНТ; В – хитозан-3 мас.% ОСУНТ. Синяя кривая – клетки после электростимуляции; красная кривая – контроль без электростимуляции

Наиболее заметный положительный ответ был получен для композита хитозан-3 мас.% ОСУНТ. Пиковые значения тока достигали ± 5 мкА. После начального периода клеточный индекс стимулированной группы превышал соответствующий показатель контроля без электростимуляции (Рисунок 3.18, В). Увеличение содержания ОСУНТ повышало число контактов между нанотрубками и способствовало более равномерному распределению тока в плоскости композитной плёнки.

Полученные данные показывают, что клеточный ответ зависел как от состава плёнки, так и от величины тока при заданном напряжении ± 100 мВ. В исследованном ряду наиболее выраженный эффект электростимуляции наблюдался на композите хитозан-3 мас.% ОСУНТ [181]. При этом результаты RTCA характеризуют совместное изменение количества клеток, их адгезии и расплывания, поэтому не позволяют связать повышение клеточного индекса только с усилением пролиферации. Выбор состава также должен учитывать исходную биосовместимость материала, оценённую с помощью МТТ-теста.

3.9.2 Электростимуляция клеток на поверхности композитных плёнок полиимид-графен

Электростимуляцию фибробластов на плёнках полиимид-графен проводили в тех же условиях, что и на плёнках хитозан-ОСУНТ. Клетки культивировали непосредственно на поверхности материалов. На электроды в течение 4 ч подавали переменный прямоугольный потенциал с амплитудой 100 мВ и сменой полярности каждые 30 с. Контролем служили клетки на плёнке того же состава без электростимуляции.

Подаваемый потенциал во всех группах оставался одинаковым. При этом ток зависел от электрического сопротивления плёнки и увеличивался с ростом содержания графена. Для ненаполненного полиимида его максимальное значение составляло около 0,2 мкА, для композитов с 0,5 и 1 мас.% графена соответственно 0,5 и 15 мкА. При содержании 3 мас.% графена ток возрастал примерно до 2 мА.

На ненаполненной плёнке полиимида кривые клеточного индекса стимулированной и контрольной групп практически совпадали на протяжении всего периода наблюдения (Рисунок 3.19, А). Это показывает, что однократная электростимуляция при токе около 0,2 мкА не оказывала заметного влияния на клеточный ответ. Сама полиимидная матрица сохраняет биосовместимость, но без введения проводящего наполнителя не обеспечивает заметного электростимулирующего эффекта.

Для композита полиимид-0,5 мас.% графена различия между группами также оставались небольшими (Рисунок 3.19, Б). При токе около $\pm 0,5$ мкА стимулированные клетки не демонстрировали выраженного увеличения клеточного индекса относительно контроля.

Наиболее заметный положительный эффект наблюдался на плёнке полиимид-1 мас.% графена при токе около ± 15 мкА (Рисунок 3.19, В). После начального отставания клеточный индекс стимулированной группы достигал, а затем превышал контрольные значения. Среди исследованных составов эта плёнка обеспечивала наиболее благоприятный клеточный ответ при потенциале ± 100 мВ.

При увеличении содержания графена до 3 мас.% ток возрастал примерно до 2 мА. В этих условиях клеточный индекс стимулированных фибробластов был ниже контрольного на протяжении большей части периода наблюдения (Рисунок 3.19, Г). Следовательно, увеличение проводимости плёнки и соответствующий рост тока не приводили к усилению положительного эффекта. Напротив, ток порядка единиц миллиампер при выбранном режиме оказывал неблагоприятное влияние на клеточный ответ.

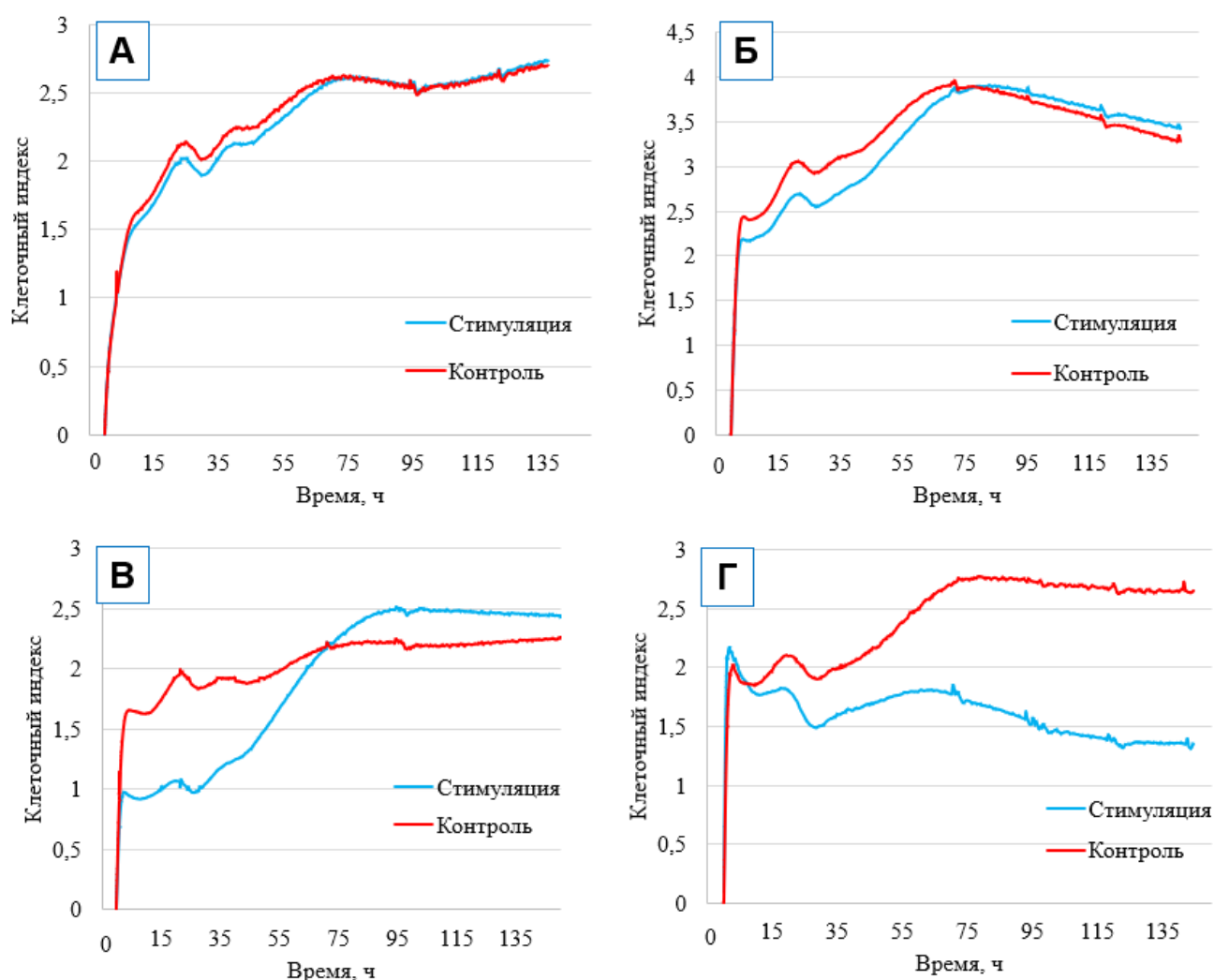


Рисунок 3.19 – Динамика клеточного роста дермальных фибробластов человека после электростимуляции плёноках полиимид-графен: А – ненаполненный полиимид; Б – полиимид-0,5 мас.% графена; В – полиимид-1 мас.% графена; Г – полиимид-3 мас.% графена. Синяя кривая – клетки после электростимуляции; красная кривая – контроль без электростимуляции

Полученные результаты показывают, что максимальная электропроводность материала не обеспечивает наиболее выраженного клеточного ответа. Для исследованных плёнок и выбранного низкочастотного режима рабочий диапазон электропроводности составлял приблизительно 0,1 – 10 См/м. Такой уровень позволял передавать электрический сигнал без чрезмерного увеличения тока. Наиболее выраженная положительная динамика клеточного индекса наблюдалась для композита полиимид-1 мас.% графена при потенциале ± 100 мВ и токе около ± 15 мкА.

В условиях используемой экспериментальной системы нижний уровень, при котором регистрировался клеточный ответ, составлял около 1 мкА при потенциале не менее 50 мВ. При увеличении тока до миллиамперного диапазона возрастал риск неблагоприятного воздействия на клетки. Эти значения характеризуют рабочее «терапевтическое окно» для применённой установки и низкочастотного режима, но не являются универсальными порогами для других материалов и схем электростимуляции.

При потенциале ± 100 мВ ток через композит с 3 мас.% графена достигал приблизительно ± 2 мА и сопровождался снижением клеточного индекса. Для уменьшения тока до уровня, полученного для плёнки с 1 мас.% графена, потребовалось бы снизить потенциал примерно до 0,5 – 1 мВ. Такой режим в работе не исследовали. Поэтому композит с 3 мас.% графена не подходил для использованного протокола ± 100 мВ, несмотря на его более высокую электропроводность. Наиболее подходящее сочетание электрических и механических свойств при выбранном режиме обеспечивал композит полиимид-1 мас.% графена.

3.9.3 Электростимуляция клеток в комбинированной двухслойной системе

На основании результатов прямой электростимуляции клеток на поверхности электропроводящих плёнок был предложен второй подход, основанный на разделении функций клеточного субстрата и токопроводящего слоя. В этой схеме клетки высаживали не непосредственно на проводящий композит, а на поверхность

ненаполненной хитозановой плёнки, плотно прижатой к электропроводящей подложке. Такое конструктивное решение позволяло исключить прямой контакт клеток с углеродным наполнителем и одновременно сохранить передачу электрического сигнала к клеточному слою.

Верхний слой выполнял функцию биосовместимого интерфейса между клетками и проводящей подложкой. Для его получения использовали ненаполненный хитозан. Его поверхность характеризовалась краевым углом смачивания, благоприятным для адгезии клеток, а в набухшем состоянии хитозановая матрица участвовала в ионном переносе заряда.

Нижний слой представлял собой электронно-проводящую подложку из композита полиимид-1 мас.% графена. Его удельная электропроводность составляла около 0,5 См/м и входила в установленный для исследованной системы рабочий диапазон 0,1 – 10 См/м. Плёнка сохраняла целостность при установке в ячейку, фиксации и последующем извлечении. Плёнка сохраняла устойчивость при контакте с культуральной средой, физиологическим раствором и биологическими жидкостями.

Выбор композита полиимид-1 мас.% графена был основан на совокупности электрических, механических и биологических характеристик. При потенциале ± 100 мВ через этот материал протекал ток около ± 15 мкА, при котором наблюдалась наиболее выраженная положительная динамика клеточного индекса. По результатам механических испытаний плёнка сохраняла разрывную прочность и относительную деформацию при разрыве, необходимые для её установки, фиксации и извлечения из экспериментальной ячейки. В отличие от композита с 3 мас.% графена, для неё не наблюдалось резкого снижения деформации при разрыве. Результаты МТТ-теста также не выявили выраженного отрицательного влияния 1 мас.% графена на метаболическую активность фибробластов. Поэтому данный состав обеспечивал наиболее подходящее сочетание электропроводности, механических характеристик и биосовместимости для использования в двухслойной системе.

В двухслойной системе полиимид-1 мас.% графена формировал непрерывный электронно-проводящий нижний слой. Набухшая хитозановая плёнка непосредственно контактировала с клетками и обеспечивала ионный перенос между проводящей подложкой и клеточной средой. Такая конструкция позволяла отделить клетки от графенсодержащей поверхности и одновременно сохранить возможность электрического воздействия.

Электростимуляцию проводили П-образным потенциалом со сменой полярности каждые 30 с. Основным режимом была амплитуда 100 мВ. Дополнительно использовали режим ± 500 мВ для оценки влияния более высокой амплитуды на клеточный ответ. Эффект стимуляции изучали на двух клеточных культурах, имеющих ключевое значение для регенерации кожи: дермальных фибробластах человека и кератиноцитах линии HaCaT.

Электростимуляция фибробластов в комбинированной двухслойной системе оказала положительное влияние на последующую динамику клеточного индекса. Согласно данным RTCA iCELLigence (Рисунок 3.20), в первые часы после воздействия стимулированные клетки демонстрировали более низкие значения CI по сравнению с контролем. Вероятно, это отражает период адаптации клеток после электрического воздействия и перестройки их контакта с субстратом.

В дальнейшем различия между группами изменялись. Кривая стимулированных клеток при амплитуде 100 мВ выходила выше контрольной и достигала наибольших значений клеточного индекса. Максимальный CI для этой группы составлял около 4,18, тогда как в контроле он был ниже и составлял около 3,76. Таким образом, после однократной электростимуляции при ± 100 мВ максимальное значение клеточного индекса было выше контроля примерно на 11 %. При амплитуде 500 мВ также наблюдался положительный эффект по сравнению с контролем, однако, максимальное значение CI составляло около 3,99, что превышало контроль примерно на 6 %. При этом режим ± 100 мВ обеспечивал примерно на 5 % более высокий максимум CI по сравнению с режимом ± 500 мВ.

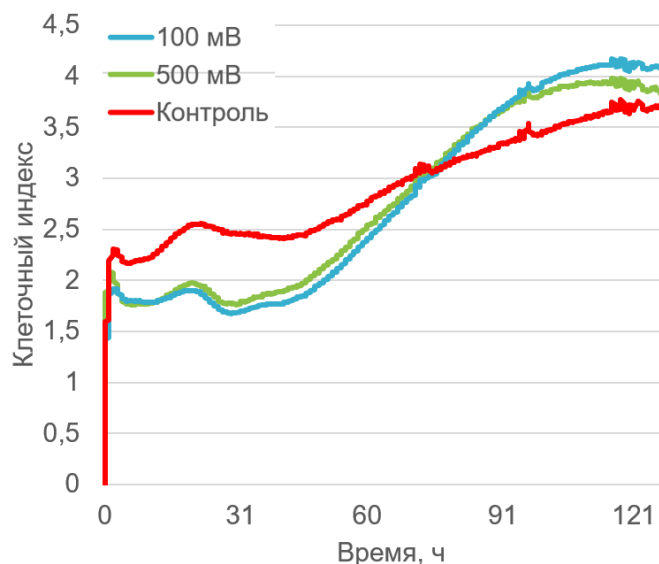


Рисунок 3.20 – Динамика клеточного роста дермальных фибробластов человека после электростимуляции в комбинированной двухслойной системе: клетки культивировали на хитозановой плёнке, плотно прижатой к проводящей подложке полиимид-графен. Синяя кривая – электростимуляция при ± 100 мВ, зелёная – при ± 500 мВ, красная – контроль без электростимуляции.

Таким образом, для дермальных фибробластов в двухслойной системе наиболее эффективным оказался режим ± 100 мВ. Он обеспечивал более выраженный прирост клеточного индекса на стадии активной пролиферации без признаков подавления клеточного роста. Увеличение амплитуды до 500 мВ не усиливало стимулирующий эффект, что указывает на необходимость подбора мягкого режима воздействия, согласованного с электрофизическими свойствами двухслойной конструкции.

При исследовании кератиноцитов линии HaCaT в комбинированной двухслойной системе было установлено, что электростимуляция также оказывает положительное влияние на динамику клеточного индекса (Рисунок 3.21). Наиболее выраженный эффект наблюдался при амплитуде 100 мВ. Кривая CI располагалась выше контрольной группы и выше кривой, полученной при ± 500 мВ. Максимальное значение клеточного индекса при ± 100 мВ составляло около 3,11, тогда как в контроле оно достигало примерно 2,68. Таким образом, после

однократной электростимуляции при ± 100 мВ максимальный клеточный индекс был выше контроля примерно на 16 %.

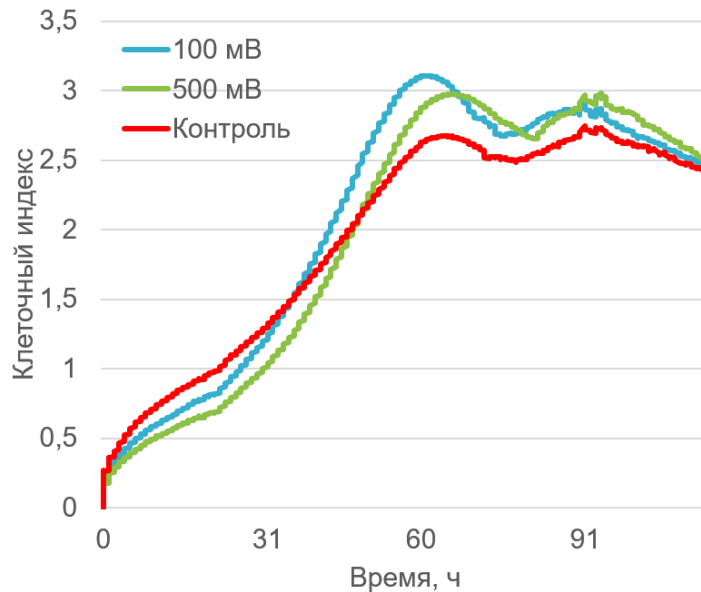


Рисунок 3.21 – Динамика клеточного роста кератиноцитов линии HaCaT после электростимуляции в комбинированной двухслойной системе: клетки культивировали на хитозановой плёнке, плотно прижатой к проводящей подложке полиимид-графен. Синяя кривая – электростимуляция при ± 100 мВ, зелёная – при ± 500 мВ, красная – контроль без электростимуляции.

При амплитуде 500 мВ также наблюдалось увеличение CI по сравнению с контролем, однако, эффект был менее выраженным. Максимальное значение клеточного индекса составляло около 2,93, что превышало контроль примерно на 9 %, но было ниже результата, полученного при ± 100 мВ. Разница между режимами ± 100 и ± 500 мВ составляла около 6 % в пользу более «мягкого» режима стимуляции.

Как для кератиноцитов линии HaCaT, так и для дермальных фибробластов наиболее эффективным оказался режим с амплитудой потенциала 100 мВ, при котором ток составлял около 10 мкА. После однократной электростимуляции в этом режиме наблюдался максимальный прирост клеточного индекса. При увеличении амплитуды потенциала до 500 мВ ток возрастал примерно до 50 мкА, однако дополнительного усиления клеточного ответа не происходило. Полученные данные

подтверждают, что в комбинированной двухслойной системе положительный клеточный ответ определяется не повышением напряжения, а согласованием параметров сигнала с электрофизическими свойствами конструкции.

В целом результаты импедансного анализа показывают эффективность второй схемы электростимуляции, при которой клетки культивировали на хитозановой плёнке, плотно прилегающей к проводящему слою полиимид-графен. Такая конфигурация обеспечивает биосовместимый контакт клеток с хитозаном и передачу электрического сигнала через гидратированный промежуточный слой. Оптимальная амплитуда 100 мВ была достаточной для стимуляции как фибробластов, так и кератиноцитов HaCaT, что делает двухслойную систему более предпочтительной по сравнению с прямым контактом клеток с электропроводящим композитом.

3.10 Влияние электростимуляции на морфологию клеток

Для оценки морфологических изменений фибробластов после электростимуляции применяли флуоресцентную микроскопию. Исследование проводили на 3-и сутки после однократной электростимуляции в комбинированной двухслойной системе, где клетки культивировали на хитозановой плёнке, плотно прижатой к проводящей подложке полиимид-1 мас.% графена. В контрольной и опытной группах использовали одинаковую плотность посева клеток. В качестве маркеров применяли антитела к α -гладкомышечному актину, конъюгированные с Alexa Fluor 488, а ядра клеток окрашивали DAPI.

Флуоресцентная микроскопия показала заметные различия в морфологии фибробластов контрольной и стимулированной групп. В контроле клетки имели преимущественно вытянутую веретенообразную форму, располагались разреженно и формировали отдельные межклеточные контакты. Зелёный флуоресцентный сигнал был выражен умеренно и распределялся преимущественно в цитоплазме клеток (Рисунок 3.22, А).

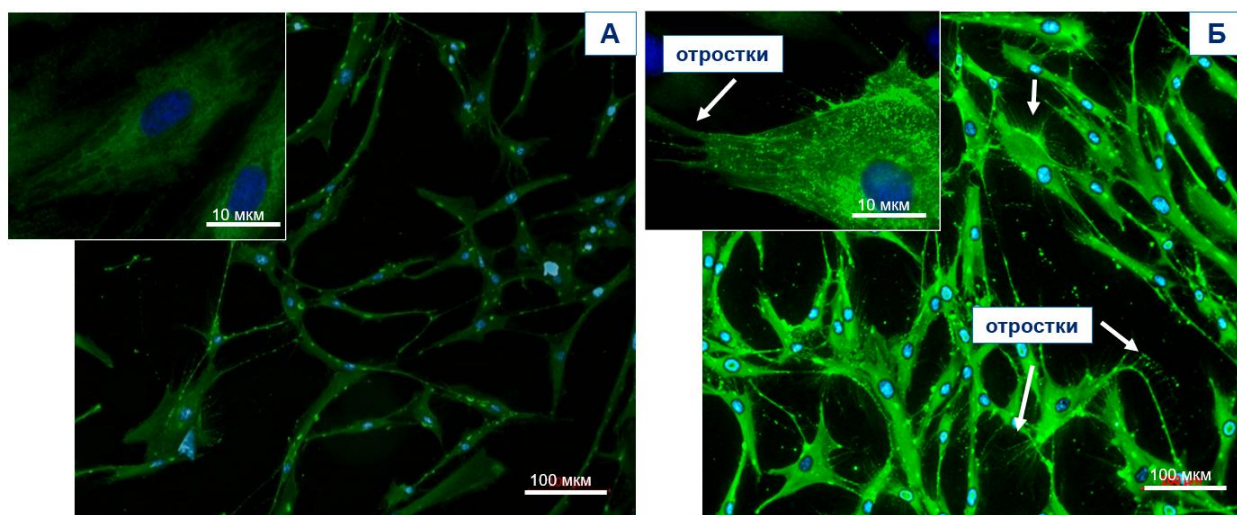


Рисунок 3.22 – Флуоресцентная микроскопия дермальных фибробластов человека после культивирования в комбинированной двухслойной системе: А – контроль без электростимуляции; Б – клетки после электростимуляции. Зелёный сигнал – α -SMA/Alexa Fluor 488, синий сигнал – ядра клеток, окрашенные DAPI. Стрелками указаны цитоплазматические отростки стимулированных клеток

После электростимуляции фибробласты выглядели более распластанными и морфологически активными. Увеличивалось количество цитоплазматических отростков, клетки формировали более выраженную сеть межклеточных контактов, а флуоресцентный сигнал α -SMA становился интенсивнее и более структурированным. На увеличенных фрагментах изображения хорошо видны тонкие клеточные отростки, отходящие от тела клетки и участвующие в формировании клеточной сети (Рисунок 3.22, Б).

Для дополнительной оценки перестройки цитоскелета фибробластов после электростимуляции проводили окрашивание F-актина с использованием Texas Red-X Phalloidin. Этот краситель позволяет визуализировать актиновые филаменты, в том числе стресс-фибриллы, участвующие в распластывании клеток, формировании клеточного натяжения и адгезионных контактов.

В контрольной группе актиновый цитоскелет был выражен менее равномерно. Отдельные стресс-фибриллы визуализировались, однако, их

плотность и протяжённость были ниже (Рисунок 3.23, А). После электростимуляции наблюдалось усиление красного флуоресцентного сигнала и формирование более выраженных актиновых стресс-фибрилл, ориентированных преимущественно вдоль длинной оси клеток (Рисунок 3.23, Б). Такая картина указывает на ремоделирование цитоскелета, более активное распластывание фибробластов и усиление их взаимодействия с поверхностью.

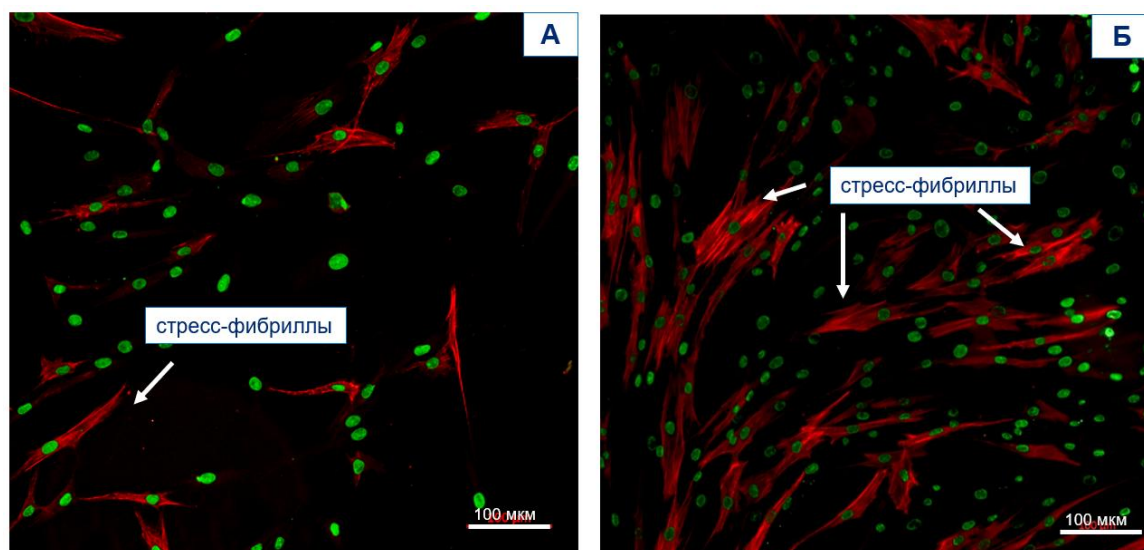


Рисунок 3.23 – Флуоресцентная микроскопия актинового цитоскелета дермальных фибробластов человека после культивирования в комбинированной двухслойной системе: А – контроль без электростимуляции; Б – клетки после электростимуляции. Красный сигнал – F-актин, окрашенный Texas Red-X Phalloidin; зелёный сигнал – ламин А/С в области ядер. Стрелками указаны актиновые стресс-фибриллы

Данные флуоресцентной микроскопии подтверждают, что электростимуляция в двухслойной системе влияет не только на динамику клеточного роста по данным RTCA, но и на морфологическое состояние фибробластов. После воздействия клетки демонстрируют более выраженное распластывание, развитие отростков и усиление цитоскелетной организации, что указывает на активацию адгезии и межклеточных взаимодействий.

Для оценки влияния электростимуляции на морфологию и распределение кератиноцитов линии HaCaT, экспрессирующих красный флуоресцентный белок

RFP, использовали прижизненную флуоресцентную микроскопию. Наблюдение проводили на 2-е сутки после электростимуляции в комбинированной двухслойной системе. В контрольной группе клетки выращивали в аналогичных условиях, но без воздействия электрического поля. Плотность посева во всех группах была одинаковой.

В контрольной группе кератиноциты формировали клеточный слой неоднородной плотности (Рисунок 3.24, А). На изображении видны участки с более плотным расположением клеток и области с выраженными межклеточными промежутками. Морфология культуры оставалась неоднородной. Так часть клеток имела округлую или полигональную форму, распределение по поверхности было неравномерным.

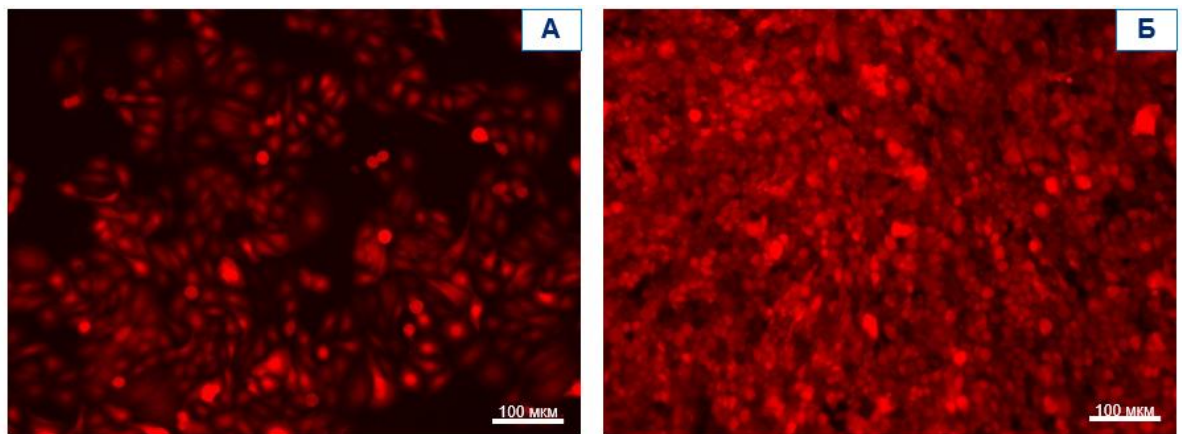


Рисунок 3.24 – Прижизненная флуоресцентная микроскопия кератиноцитов линии HaCaT RFP после культивирования в комбинированной двухслойной системе: А – контроль без электростимуляции; Б – клетки после электростимуляции. Красный сигнал – экспрессия RFP клетками HaCaT

После электростимуляции клеточный слой становился более плотным и равномерным (Рисунок 3.24, Б). Количество межклеточных промежутков уменьшалось, клетки располагались компактнее, формируя более сплошное покрытие поверхности. Такая картина согласуется с данными RTCA, где для кератиноцитов HaCaT после стимуляции при ± 100 мВ наблюдалось увеличение максимального клеточного индекса по сравнению с контролем.

Прижизненная флуоресцентная микроскопия показала, что электростимуляция в комбинированной двухслойной системе способствует повышению плотности клеточного слоя HaCaT и более равномерному распределению кератиноцитов на поверхности хитозановой плёнки. В совокупности с результатами RTCA это подтверждает положительное влияние мягкого электрического воздействия на поведение эпителиальных клеток кожи.

Результаты флуоресцентной микроскопии показали благоприятные изменения морфологии обоих исследованных типов клеток после электростимуляции. У фибробластов наблюдались более выраженное распластывание и реорганизация цитоскелета, свидетельствующие о повышении их функциональной активности. У кератиноцитов линии HaCaT изменения проявлялись в более плотном расположении, выравнивании и ориентации клеток. Эти наблюдения согласуются с увеличением клеточного индекса и указывают на положительное влияние выбранного режима электростимуляции на морфологию и пролиферативную активность клеток кожи, имеющие значение для регенеративных процессов.

3.11 Влияние электрического поля на кинетику заживления ран в экспериментах *in vivo*

Заживление раны представляет собой сложный биологический процесс, включающий стадии гемостаза, воспаления, пролиферации и ремоделирования. На каждой стадии участвуют различные клеточные и молекулярные механизмы, поэтому применение электрического воздействия может влиять на регенерацию тканей не в один момент, а постепенно, по мере развития раневого процесса. В данной работе электростимуляцию не проводили на стадии гемостаза, воздействие начинали со 2-х суток после операции, то есть в ранний период воспалительной фазы.

Электростимуляцию проводили по двухконтактной биполярной схеме. Непосредственно на раневую поверхность помещали сплошную плёнку ненаполненного хитозана, поверх которой располагали сплошную электропроводящую плёнку полиимид-1 мас.% графена. Таким образом, полиимид-

графеновый слой не контактировал непосредственно с раной, а был отделён от неё набухшей хитозановой плёнкой. Электрические контакты присоединяли к противоположным краям полиимид-графенового слоя. Продолжительность одного сеанса электростимуляции составляла 1 ч.

После завершения сеанса провода отсоединяли, а двухслойное покрытие оставляли на ране под послеоперационной повязкой до следующей процедуры. Каждые 24 ч покрытие увлажняли и осторожно снимали для фотофиксации состояния раны, после чего заменяли новым. Контрольную рану лечили по стандартному протоколу с использованием повязки, смоченной раствором хлоргексидина.



Рисунок 3.25 – Внешний вид ран на 5-е сутки после операции: верхняя рана – контрольная, обработанная по стандартному протоколу; нижняя рана – стимулированная с использованием двухслойной электропроводящей системы

На 5-е сутки после операции обе раны имели сходный внешний вид (Рисунок 3.25). Выраженных признаков усиленного воспаления, отёка или нагноения в области стимулированной раны визуально не наблюдалось. Это важно, поскольку стимулированная рана не подвергалась стандартной обработке хлоргексидином, а находилась под хитозановым покрытием и электропроводящей системой.

Следовательно, использованный режим электростимуляции и конструкция биоэлектрода не вызывали видимого повреждающего действия на раннем этапе заживления и не ухудшали течение воспалительной фазы.

На 9-е сутки после операции различия между контрольной и стимулированной ранами становились более заметными (Рисунок 3.26). Протокол электростимуляции на данном этапе сохранялся прежним: воздействие проводили в течение 1 ч, расположение электродов и хитозанового покрытия не изменяли.

Стимулированная рана имела меньший видимый размер по сравнению с контрольной. Её края выглядели более сближенными, поверхность была более сухой и организованной, без выраженных признаков воспалительной реакции. Это может указывать на более активное сокращение раневого дефекта и переход к пролиферативной фазе заживления.



Рисунок 3.26 – Внешний вид ран на 9-е сутки после операции: верхняя рана – контрольная, обработанная по стандартному протоколу; нижняя рана – стимулированная с использованием двухслойной электропроводящей системы

Контрольная рана на 9-е сутки сохраняла больший размер, её поверхность выглядела менее равномерной, а края – менее стянутыми. Такие визуальные различия позволяют предположить, что при стандартном уходе процессы сокращения раневой поверхности и формирования грануляционной ткани

протекали менее интенсивно, чем в условиях электростимуляции. На 9 сутки стимулированная рана переходит в стадию активного тканевого восстановления, тогда как контрольная остаётся преимущественно на границе воспалительной и пролиферативной фаз.

На 14-е сутки после операции различия между контрольной и стимулированной ранами становились ещё более выраженными (Рисунок 3.27). Стимулированная рана имела меньший видимый размер, её края были ближе друг к другу, а поверхность выглядела более сухой и организованной. Визуально это указывает на более активное сокращение раневого дефекта и формирование грануляционного покрытия.

Контрольная рана к этому сроку сохраняла больший размер. Её поверхность выглядела менее равномерной, а края были менее стянуты, что свидетельствует о более медленном течении репаративных процессов по сравнению со стимулированной раной.



Рисунок 3.27 – Внешний вид ран на 14-е сутки после операции: верхняя рана – контрольная, обработанная по стандартному протоколу; нижняя рана – стимулированная с использованием двухслойной электропроводящей системы

Можно заметить, что к 14-м суткам электростимуляция сопровождалась более выраженным уменьшением площади раневого дефекта и более организованным внешним видом раневой поверхности. Полученные данные позволяют предположить ускорение перехода стимулированной раны через пролиферативную фазу заживления, тогда как в контрольной ране процессы сокращения и формирования новой ткани протекали медленнее.

На 19-е сутки различия между контрольной и стимулированной ранами становились наиболее выраженными. К этому сроку стимулированная рана заметно уменьшалась в размерах, её края были еще ближе друг к другу, а поверхность выглядела более сухой и организованной. В области стимулированной раны отмечалось формирование плотного грануляционного покрытия и признаки активного сокращения раневого дефекта. В связи с этим проведение электростимуляции было завершено на 19-е сутки.

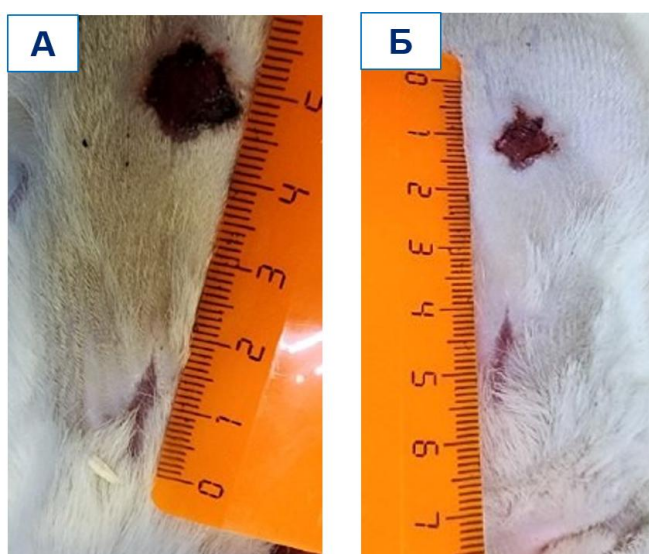


Рисунок 3.28 – Внешний вид ран на 19-е (А) и 23-и (Б) сутки после операции: верхняя рана – контрольная, обработанная по стандартному протоколу; нижняя рана – стимулированная с использованием двухслойной электропроводящей системы

Контрольная рана к этому сроку сохраняла больший размер и менее равномерную поверхность, что указывало на более медленное течение репаративных процессов (Рисунок 3.28, А). После прекращения

электростимуляции дальнейшее наблюдение проводили без дополнительного электрического воздействия, чтобы оценить сохранение достигнутого эффекта на завершающем этапе заживления.

На 23-и сутки стимулированная рана имела минимальную площадь и выглядела практически полностью эпителизированной (Рисунок 3.28, Б). Поверхность была сухой и ровной, без визуальных признаков выраженного воспаления. В контрольной ране сохранялся более заметный остаточный дефект, а края и поверхность выглядели менее организованными. Эти различия показывают, что эффект, сформированный в период электростимуляции, сохранялся и после прекращения воздействия.

Результаты *in vivo* свидетельствуют о том, что применение двухслойной системы на основе проводящего слоя полиимид-1 мас.% графена и хитозанового контактного слоя сопровождалось ускоренным уменьшением площади раневого дефекта и более организованным внешним видом раневой поверхности. Полиимид-графен был выбран вместо хитозан-ОСУНТ, поскольку он сохранял целостность, механические свойства и электронную проводимость во влажной среде, тогда как хитозан-ОСУНТ значительно гидратировался и обладал менее стабильными электрическими характеристиками. При этом содержание 1 мас.% графена обеспечивало приемлемую деформируемость плёнки и ток в рабочем диапазоне при выбранном режиме электростимуляции.

Полученные данные подтверждают перспективность разработанной конструкции биоэлектрода для локальной стимуляции процессов кожной регенерации. При этом наиболее корректно рассматривать выявленный эффект как ускорение визуальных признаков заживления и улучшение динамики закрытия раны, поскольку для окончательной оценки качества ремоделирования ткани и выраженности рубцевания необходимы дополнительные морфологические исследования.

В совокупности результаты клеточных исследований *in vitro* и экспериментов *in vivo* показывают, что эффективность электростимуляции определяется сочетанием электропроводности материала, двухслойной архитектуры с

биосовместимым хитозановым слоем и параметров воздействия. В условиях использованной экспериментальной системы наиболее благоприятный клеточный ответ наблюдался при токах около 10-20 мкА, тогда как дальнейшее увеличение тока не усиливало положительный эффект.

ВЫВОДЫ

1. Получены плёночные композиционные материалы на основе хитозана с ОСУНТ и полиимида Р-ОДФО с графеном для применения в системах электростимуляции. С учётом баланса электрических, поверхностных, механических характеристик и биосовместимости определены составы композитов, оптимальные для электростимуляции клеток кожи.
2. Разработана и применена в ходе исследований экспериментальная ячейка для электростимуляции клеток *in vitro* с одновременной регистрацией тока.
3. Установлено, что в культуральной среде композиты хитозан-ОСУНТ характеризуются смешанным электронно-ионным переносом заряда, тогда как в композитах полиимид-графен с содержанием графена 1 – 3 мас.% преобладает электронная составляющая тока.
4. Установлено, что электростимуляция клеток на поверхности электропроводящих композитов переменным потенциалом ± 100 мВ со сменой полярности каждые 30 с в течение 4 ч положительно влияет на последующий рост дермальных фибробластов человека. Повышение электропроводности композитов не всегда усиливает этот эффект. При токах миллиамперного диапазона на полиимид-графеновых плёнках наблюдалось подавление клеточного роста.
5. Разработан и получен двухслойный полимерный композит для применения в качестве раневого покрытия при электростимуляции. Проводящий слой полиимид-1 мас.% графена обеспечивает подведение электрического сигнала, а биосовместимый хитозановый слой исключает прямой контакт клеток и раневой поверхности с углеродным наполнителем.
6. Электростимуляция в двухслойной системе при напряжении ± 100 мВ в течение 4 ч обеспечивала более выраженный последующий рост культур дермальных фибробластов человека и кератиноцитов HaCaT по сравнению с контролем без стимуляции. Воздействие также сопровождалось изменениями морфологии клеток.

7. В эксперименте *in vivo* применение двухслойного раневого покрытия в системе для электростимуляции тканей способствовало увеличению динамики заживления полнослойных кожных ран у крыс по сравнению с контрольными ранами, получившими стандартный уход. К 23-м суткам стимулированные раны были практически полностью эпителизированы и не демонстрировали видимых признаков инфицирования, воспаления и гипертрофии рубцовой ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Levin, M. Bioelectric signaling: Reprogrammable circuits underlying embryogenesis, regeneration, and cancer. / M. Levin // *Cell*. – 2021. – V. 184(8). – P. 1971-1989.
2. Khan, F. Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering. / F. Khan, M. Tanaka // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – V. 19(1). – A. 17.
3. Fonner, J. M. Biocompatibility implications of polypyrrole synthesis techniques. / J. M. Fonner, L. Forciniti, H. Nguyen, J. D. Byrne, Y.-F. Kou, J. Syeda-Nawaz, C. E. Schmidt // *Biomedical Materials*. – 2008. – V. 3(3). – A. 034124.
4. Min, J. H. Incorporation of Conductive Materials into Hydrogels for Tissue Engineering Applications. / J. H. Min, M. Patel, W.-G. Koh // *Polymers*. – 2018. – V. 10(10). – A. 1078.
5. Verdes, M. Status and challenges of electrical stimulation use in chronic wound healing. / M. Verdes, K. Mace, L. Margetts, S. Cartmell // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2022. – V. 75. – A. 102710.
6. Robson, M. C. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. / M. C. Robson, D. L. Steed, M. G. Franz // *Current Problems in Surgery*. – 2001. – V. 38(2). – P. 72-140.
7. Velnar, T. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. / T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj // *Journal of International Medical Research*. – 2009. – V. 37(5). – P. 1528-1542.
8. Järbrink, K. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review. / K. Järbrink, G. Ni, H. Sönnnergren, A. Schmidtchen, C. Pang, R. Bajpai, J. Car // *Systematic Reviews*. – 2017. – V. 6. – A. 15.
9. Lindholm, C. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. / C. Lindholm, R. Searle // *International Wound Journal*. – 2016. – V. 13(S2). – P. 5-15.
10. Strecker-McGraw, M. K. Soft tissue wounds and principles of healing. / M. K. Strecker-McGraw, T. R. Jones, D. G. Baer // *Emergency Medicine Clinics of North America*. – 2007. – V. 25(1). – P. 1-22.

11. Tortora, G. J. Principles of anatomy and physiology / G. J. Tortora, B. H. Derrickson.
– 15th ed. – Hoboken: Wiley, 2017. – 1248 p.
12. Gurtner, G. C. Wound repair and regeneration. / G. C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M. T. Longaker // Nature. – 2008. – V. 453. – P. 314-321.
13. Rodrigues, M. Wound healing: a cellular perspective. / M. Rodrigues, N. Kosaric, C. A. Bonham, G. C. Gurtner // Physiological Reviews. – 2019. – V. 99(1). – P. 665-706.
14. Eming, S. A. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. / S. A. Eming, P. Martin, M. Tomic-Canic // Science Translational Medicine. – 2014. – V. 6(265). – A. 265sr6.
15. Pastar, I. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. / I. Pastar, O. Stojadinovic, N. C. Yin, H. Ramirez, A. G. Nusbaum, A. Sawaya, S. B. Patel, L. Khalid, R. R. Isseroff, M. Tomic-Canic // Advances in Wound Care. – 2014. – V. 3(7). – P. 445-464.
16. McCaig, C. D. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. / C. D. McCaig, A. M. Rajnicek, B. Song, M. Zhao // Physiological Reviews. – 2005. – V. 85(3). – P. 943-978.
17. Kim, H.-S. Biomaterials-enabled electrical stimulation for tissue healing and regeneration. / H.-S. Kim, T. Baby, J.-H. Lee, U. S. Shin, H.-W. Kim // Med-X. – 2024. – V. 2. – A. 7.
18. Levin, M. Endogenous bioelectric signaling networks: Exploiting voltage gradients for control of growth and form. / M. Levin, G. Pezzulo, J. M. Finkelstein // Annual Review of Biomedical Engineering. – 2017. – V. 19. – P. 353-387.
19. Foulds, I. S. Human skin battery potentials and their possible role in wound healing. / I. S. Foulds, A. T. Barker // British Journal of Dermatology. – 1983. – V. 109(5). – P. 515-522.
20. Mohajeri-Tehrani, M. R. Effect of low-intensity direct current on expression of vascular endothelial growth factor and nitric oxide in diabetic foot ulcers. / M. R. Mohajeri-Tehrani, F. Nasiripoor, G. Torkaman, M. Hedayati, Z. Annabestani, M. R. Asadi // Journal of Rehabilitation Research and Development. – 2014. – V. 51(5). – P. 815-824.

21. Zhao, M. Electrical fields in wound healing—An overriding signal that directs cell migration. / M. Zhao // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2009. – V. 20(6). – P. 674-682.
22. Martin-Granados, C. Harnessing the electric spark of life to cure skin wounds. / C. Martin-Granados, C. D. McCaig // *Advances in Wound Care*. – 2014. – V. 3(2). – P. 127-138.
23. Nuccitelli, R. Imaging the electric field associated with mouse and human skin wounds. / R. Nuccitelli, P. Nuccitelli, S. Ramlatchan, R. Sanger, P. J. S. Smith // *Wound Repair and Regeneration*. – 2008. – V. 16(3). – P. 432-441.
24. Zhao, M. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. / M. Zhao, B. Song, J. Pu, T. Wada, B. Reid, G. Tai, F. Wang, A. Guo, P. Walczysko, Y. Gu, T. Sasaki, A. Suzuki, J. V. Forrester, H. R. Bourne, P. N. Devreotes, C. D. McCaig, J. M. Penninger // *Nature*. – 2006. – V. 442(7101). – P. 457-460.
25. Guo, S. Factors affecting wound healing. / S. Guo, L. A. DiPietro // *Journal of Dental Research*. – 2010. – V. 89(3). – P. 219-229.
26. Frykberg, R. G. Challenges in the treatment of chronic wounds. / R. G. Frykberg, J. Banks // *Advances in Wound Care*. – 2015. – V. 4(9). – P. 560-582.
27. Barnes, R. Electrical stimulation vs. standard care for chronic ulcer healing: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. / R. Barnes, Y. Shahin, R. Gohil, I. Chetter // *European Journal of Clinical Investigation*. – 2014. – V. 44(4). – P. 429-440.
28. Kloth, L. C. Electrical Stimulation Technologies for Wound Healing. / L. C. Kloth // *Advances in Wound Care*. – 2014. – V. 3(2). – P. 81-90.
29. Bai, H. DC electric stimulation upregulates angiogenic factors in endothelial cells through activation of VEGF receptors. / H. Bai, J. V. Forrester, M. Zhao // *Cytokine*. – 2011. – V. 55(1). – P. 110-115.
30. Rouabhia, M. Electrical stimulation promotes the proliferation of human keratinocytes, increases the production of keratin 5 and 14, and increases the phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAP kinases. / M. Rouabhia, H. J. Park, A.

- Abedin-Do, Y. Douville, M. Méthot, Z. Zhang // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2020. – V. 14(7). – P. 909-919.
31. Oliveira, K. M. C. Electrical stimulation shifts healing/scarring towards regeneration in a rat limb amputation model. / K. M. C. Oliveira, J. H. Barker, E. Berezikov, L. Pindur, S. Kynigopoulos, M. Eischen-Loges, Z. Han, M. B. Bhavsar, D. Henrich, L. Leppik // *Scientific Reports*. – 2019. – V. 9. – A. 11433.
 32. Rajendran, S. B. Electrical stimulation to enhance wound healing. / S. B. Rajendran, K. Challen, K. L. Wright, J. G. Hardy // *Journal of Functional Biomaterials*. – 2021. – V. 12(2). – A. 40.
 33. Diegelmann, R. F. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. / R. F. Diegelmann, M. C. Evans // *Frontiers in Bioscience*. – 2004. – V. 9. – P. 283-289.
 34. Murillo, G. Electromechanical Nanogenerator–Cell Interaction Modulates Cell Activity. / G. Murillo, A. Blanquer, C. Vargas-Estevez, L. Barrios, E. Ibáñez, C. Nogués, J. Esteve // *Advanced Materials*. – 2017. – V. 29(24). – A. 1605048.
 35. Usui, M. L. Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. / M. L. Usui, J. N. Mansbridge, W. G. Carter, M. Fujita, J. E. Olerud // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 2008. – V. 56(7). – P. 687-696.
 36. Pullar, C. E. $\beta 4$ integrin and epidermal growth factor coordinately regulate electric field-mediated directional migration via Rac1. / C. E. Pullar, B. S. Baier, Y. Kariya, A. J. Russell, B. A. Horst, M. P. Marinkovich, R. R. Isseroff // *Molecular Biology of the Cell*. – 2006. – V. 17(11). – P. 4925-4935.
 37. Balakatounis, K. C. Low-intensity electrical stimulation in wound healing: review of the efficacy of externally applied currents resembling the current of injury. / K. C. Balakatounis, A. G. Angoules // *Eplasty*. – 2008. – V. 8. – A. e28.
 38. Thakral, G. Electrical stimulation to accelerate wound healing. / G. Thakral, J. LaFontaine, B. Najafi, T. K. Talal, P. Kim, L. A. Lavery // *Diabetic Foot & Ankle*. – 2013. – V. 4. – A. 22081.

39. Houghton, P. E. Electrical stimulation therapy increases rate of healing of pressure ulcers in community-dwelling people with spinal cord injury. / P. E. Houghton, K. E. Campbell, C. H. Fraser, C. Harris, D. H. Keast, P. J. Potter, K. C. Hayes, M. G. Woodbury // *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. – 2010. – V. 91(5). – P. 669-678.
40. Hinz, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. / B. Hinz // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2007. – V. 127(3). – P. 526-537.
41. Ud-Din, S. Electrical stimulation and cutaneous wound healing: a review of clinical evidence. / S. Ud-Din, A. Bayat // *Healthcare*. – 2014. – V. 2(4). – P. 445-467.
42. Merrill, D. R. Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. / D. R. Merrill, M. Bikson, J. G. R. Jefferys // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2005. – V. 141(2). – P. 171-198.
43. Cogan, S. F. Neural stimulation and recording electrodes. / S. F. Cogan // *Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2008. – V. 10. – P. 275-309.
44. Balint, R. Conductive polymers: towards a smart biomaterial for tissue engineering. / R. Balint, N. J. Cassidy, S. H. Cartmell // *Acta Biomaterialia*. – 2014. – V. 10(6). – P. 2341-2353.
45. Hardy, J. G. Biomimetic conducting polymer-based tissue scaffolds. / J. G. Hardy, J. Y. Lee, C. E. Schmidt // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2013. – V. 24(5). – P. 847-854.
46. Thrivikraman, G. Unraveling the mechanistic effects of electric field stimulation towards directing stem cell fate and function: a tissue engineering perspective. / G. Thrivikraman, S. K. Boda, B. Basu // *Biomaterials*. – 2018. – V. 150. – P. 60-86.
47. Green, R. A. Conducting polymers for neural interfaces: challenges in developing an effective long-term implant. / R. A. Green, N. H. Lovell, G. G. Wallace, L. A. Poole-Warren // *Biomaterials*. – 2008. – V. 29(24-25). – P. 3393-3399.
48. Asplund, M. Electroactive polymers for neural interfaces. / M. Asplund, T. Nyberg, O. Inganäs // *Polymer Chemistry*. – 2010. – V. 1(9). – P. 1374-1391.

49. Abidian, M. R. Multifunctional nanobiomaterials for neural interfaces. / M. R. Abidian, D. C. Martin // *Advanced Functional Materials*. – 2009. – V. 19(4). – P. 573-585.
50. Guo, B. Conducting polymers for tissue engineering. / B. Guo, P. X. Ma // *Biomacromolecules*. – 2018. – V. 19(6). – P. 1764-1782.
51. Liang, Y. Adhesive hemostatic conducting injectable composite hydrogels with sustained drug release and photothermal antibacterial activity to promote full-thickness skin regeneration during wound healing. / Y. Liang, X. Zhao, T. Hu, B. Chen, Z. Yin, P. X. Ma, B. Guo // *Small*. – 2019. – V. 15(12). – A. 1900046.
52. Rivnay, J. The rise of organic bioelectronics. / J. Rivnay, R. M. Owens, G. G. Malliaras // *Chemistry of Materials*. – 2014. – V. 26(1). – P. 679-685.
53. Owens, R. M. Organic electronics at the interface with biology. / R. M. Owens, G. G. Malliaras // *MRS Bulletin*. – 2010. – V. 35(6). – P. 449-456.
54. Ateh, D. D. Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. / D. D. Ateh, H. A. Navsaria, P. Vadgama // *Journal of the Royal Society Interface*. – 2006. – V. 3(11). – P. 741-752.
55. George, P. M. Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics. / P. M. George, A. W. Lyckman, D. A. LaVan, A. Hegde, Y. Leung, R. Avasare, C. Testa, P. M. Alexander, R. Langer, M. Sur // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26(17). – P. 3511-3519.
56. Aregueta-Robles, U. A. Organic electrode coatings for next-generation neural interfaces. / U. A. Aregueta-Robles, A. J. Woolley, L. A. Poole-Warren, N. H. Lovell, R. A. Green // *Frontiers in Neuroengineering*. – 2014. – V. 7. – A. 15.
57. Rivnay, J. Organic electrochemical transistors. / J. Rivnay, S. Inal, A. Salleo, R. M. Owens, M. Berggren, G. G. Malliaras // *Nature Reviews Materials*. – 2018. – V. 3. – A. 17086.
58. Zeglio, E. Active materials for organic electrochemical transistors. / E. Zeglio, O. Inganäs // *Advanced Materials*. – 2018. – V. 30(44). – A. 1800941.
59. Spicer, C. D. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: the importance of polymer choice. / C. D. Spicer // *Polymer Chemistry*. – 2020. – V. 11(2). – P. 184-219.

60. Lee, K. Y. Hydrogels for Tissue Engineering. / K. Y. Lee, D. J. Mooney // *Chemical Reviews*. – 2001. – V. 101(7). – P. 1869-1880.
61. Minev, I. R. Electronic dura mater for long-term multimodal neural interfaces. / I. R. Minev, P. Musienko, A. Hirsch, Q. Barraud, N. Wenger, E. M. Moraud, J. Gandar, M. Capogrosso, T. Milekovic, L. Asboth, R. F. Torres, N. Vachicouras, Q. Liu, N. Pavlova, S. Duis, A. Larmagnac, J. Vörös, S. Micera, Z. Suo, G. Courtine, S. P. Lacour // *Science*. – 2015. – V. 347(6218). – P. 159-163.
62. Yuk, H. Hydrogel bioelectronics. / H. Yuk, B. Lu, X. Zhao // *Chemical Society Reviews*. – 2019. – V. 48(6). – P. 1642-1667.
63. Wilson, C. J. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. / C. J. Wilson, R. E. Clegg, D. I. Leavesley, M. J. Pearcy // *Tissue Engineering*. – 2005. – V. 11(1-2). – P. 1-18.
64. Roach, P. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. / P. Roach, D. Farrar, C. C. Perry // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – V. 127(22). – P. 8168-8173.
65. Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. / K. Anselme // *Biomaterials*. – 2000. – V. 21(7). – P. 667-681.
66. Dalby, M. J. Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. / M. J. Dalby, N. Gadegaard, R. O. C. Oreffo // *Nature Materials*. – 2014. – V. 13(6). – P. 558-569.
67. Athanasiou, K. A. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. / K. A. Athanasiou, G. G. Niederauer, C. M. Agrawal // *Biomaterials*. – 1996. – V. 17(2). – P. 93-102.
68. Mendes, G. C. C. Ethylene oxide sterilization of medical devices: a review. / G. C. C. Mendes, T. R. S. Brandão, C. L. M. Silva // *American Journal of Infection Control*. – 2007. – V. 35(9). – P. 574-581.
69. Hetrick, E. M. Reducing implant-related infections: active release strategies. / E. M. Hetrick, M. H. Schoenfisch // *Chemical Society Reviews*. – 2006. – V. 35(9). – P. 780-789.

70. Subramanian, A. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. / A. Subramanian, U. M. Krishnan, S. Sethuraman // *Journal of Biomedical Science*. – 2009. – V. 16(1). – A. 108.
71. Spitalsky, Z. Carbon nanotube–polymer composites: chemistry, processing, mechanical and electrical properties. / Z. Spitalsky, D. Tasis, K. Papagelis, C. Galiotis // *Progress in Polymer Science*. – 2010. – V. 35(3). – P. 357-401.
72. Stankovich, S. Graphene-based composite materials. / S. Stankovich, D. A. Dikin, G. H. B. Dommett, K. M. Kohlhaas, E. J. Zimney, E. A. Stach, R. D. Piner, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff // *Nature*. – 2006. – V. 442(7100). – P. 282-286.
73. Kuilla, T. Recent advances in graphene based polymer composites. / T. Kuilla, S. Bhadra, D. Yao, N. H. Kim, S. Bose, J. H. Lee // *Progress in Polymer Science*. – 2010. – V. 35(11). – P. 1350-1375.
74. Gounden, V. Hydrogels and Wound Healing: Current and Future Prospects. / V. Gounden, M. Singh // *Gels*. – 2024. – V. 10(1). – A. 43.
75. Vomero, M. On the longevity of flexible neural interfaces: Establishing biostability of polyimide-based intracortical implants. / M. Vomero, F. Ciarpella, E. Zucchini, M. Kirsch, L. Fadiga, T. Stieglitz, M. Asplund // *Biomaterials*. – 2022. – V. 281. – A. 121372.
76. Yuan, N. Chitosan, alginate, hyaluronic acid and other novel multifunctional hydrogel dressings for wound healing: A review. / N. Yuan, K. Shao, S. Huang, C. Chen // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – V. 240. – A. 124321.
77. Li, M. Electroactive anti-oxidant polyurethane elastomers with shape memory property as non-adherent wound dressing to enhance wound healing. / M. Li, J. Chen, M. Shi, H. Zhang, P. X. Ma, B. Guo // *Chemical Engineering Journal*. – 2019. – V. 375. – A. 121999.
78. Kurowiak, J. Biodegradable Polymers in Biomedical Applications: A Review– Developments, Perspectives and Future Challenges. / J. Kurowiak, T. Klekiel, R. Będziński // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – V. 24(23). – A. 16952.

79. Cardoso, V. F. Fluorinated Polymers as Smart Materials for Advanced Biomedical Applications. / V. F. Cardoso, D. M. Correia, C. Ribeiro, M. M. Fernandes, S. Lanceros-Méndez // *Polymers*. – 2018. – V. 10(2). – A. 161.
80. Shu, J. Polyimide as a biomedical material: advantages and applications. / J. Shu, Z. Zhou, H. Liang, X. Yang // *Nanoscale Advances*. – 2024. – V. 6. – P. 4309-4324.
81. Xia, B. Biodegradable Medical Implants: Reshaping Future Medical Practice. / B. Xia, Y. Liu, Y. Xing, Z. Shi, X. Pan // *Advanced Science*. – 2025. – V. 12(35). – A. e08014.
82. Malafaya, P. B. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. / P. B. Malafaya, G. A. Silva, R. L. Reis // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2007. – V. 59(4-5). – P. 207-233.
83. Place, E. S. Complexity in biomaterials for tissue engineering. / E. S. Place, N. D. Evans, M. M. Stevens // *Nature Materials*. – 2009. – V. 8(6). – P. 457-470.
84. Boateng, J. S. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. / J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. E. Stevens, G. M. Eccleston // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2008. – V. 97(8). – P. 2892-2923.
85. Mano, J. F. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. / J. F. Mano, G. A. Silva, H. S. Azevedo, P. B. Malafaya, R. A. Sousa, S. S. Silva, L. F. Boesel, J. M. Oliveira, T. C. Santos, A. P. Marques, N. M. Neves, R. L. Reis // *Journal of the Royal Society Interface*. – 2007. – V. 4(17). – P. 999-1030.
86. Jayaram, A. K. 3D hybrid scaffolds based on PEDOT:PSS/MWCNT composites. / A. K. Jayaram, C. Pitsalidis, E. Tan, C. M. Moysidou, M. F. L. De Volder, J. S. Kim, R. M. Owens // *Frontiers in Chemistry*. – 2019. – V. 7. – A. 363.
87. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: properties and applications. / M. Rinaudo // *Progress in Polymer Science*. – 2006. – V. 31(7). – P. 603-632.
88. Croisier, F. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. / F. Croisier, C. Jérôme // *European Polymer Journal*. – 2013. – V. 49(4). – P. 780-792.

89. Ong, S.-Y. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. / S.-Y. Ong, J. Wu, S. M. Mochhala, M.-H. Tan, J. Lu // *Biomaterials*. – 2008. – V. 29(32). – P. 4323-4332.
90. Pillai, C. K. S. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. / C. K. S. Pillai, W. Paul, C. P. Sharma // *Progress in Polymer Science*. – 2009. – V. 34(7). – P. 641-678.
91. Dash, M. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. / M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, E. Chiellini // *Progress in Polymer Science*. – 2011. – V. 36(8). – P. 981-1014.
92. Liu, Y. Soft and elastic hydrogel-based microelectronics for localized low-voltage neuromodulation. / Y. Liu, J. Liu, S. Chen, T. Lei, Y. Kim, S. Niu, H. Wang, X. Wang, A. M. Foudeh, J. B.-H. Tok, Z. Bao // *Nature Biomedical Engineering*. – 2019. – V. 3(1). – P. 58-68.
93. Soroushanova, A. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. / A. Soroushanova, L. M. Delgado, Z. Wu, N. Shologu, A. Kshirsagar, R. Raghunath, A. M. Mullen, Y. Bayon, A. Pandit, M. Raghunath, D. I. Zeugolis // *Advanced Materials*. – 2019. – V. 31(1). – A. 1801651.
94. Parenteau-Bareil, R. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. / R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod // *Materials*. – 2010. – V. 3(3). – P. 1863-1887.
95. Yue, K. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. / K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M. M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi, A. Khademhosseini // *Biomaterials*. – 2015. – V. 73. – P. 254-271.
96. Echave, M. C. Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering. / M. C. Echave, L. Saenz del Burgo, J. L. Pedraz, G. Orive // *Current Pharmaceutical Design*. – 2017. – V. 23(24). – P. 3567-3584.
97. Lee, K. Y. Alginate: properties and biomedical applications. / K. Y. Lee, D. J. Mooney // *Progress in Polymer Science*. – 2012. – V. 37(1). – P. 106-126.

98. Rastogi, P. Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. / P. Rastogi, B. Kandasubramanian // *Biofabrication*. – 2019. – V. 11(4). – A. 042001.
99. Farokhi, M. Overview of silk fibroin use in wound dressings. / M. Farokhi, F. Mottaghitab, Y. Fatahi, A. Khademhosseini, D. L. Kaplan // *Trends in Biotechnology*. – 2018. – V. 36(9). – P. 907-922.
100. Yong, J. A Silk Fibroin Bio-Transient Solution Processable Memristor. / J. Yong, B. Hassan, Y. Liang, K. Ganesan, R. Rajasekharan, R. Evans, G. Egan, O. Kavehei, J. Li, G. Chana, B. Nasr, E. Skafidas // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – A. 14731.
101. Feng, P. Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair: Mechanisms and Applications. / P. Feng, Y. Luo, C. Ke, H. Qiu, W. Wang, Y. Zhu, R. Hou, L. Xu, S. Wu // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – V. 9. – A. 650598.
102. Rezwan, K. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. / K. Rezwan, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, A. R. Boccaccini // *Biomaterials*. – 2006. – V. 27(18). – P. 3413-3431.
103. Woodruff, M. A. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. / M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher // *Progress in Polymer Science*. – 2010. – V. 35(10). – P. 1217-1256.
104. Guelcher, S. A. Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine. / S. A. Guelcher // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2008. – V. 14(1). – P. 3-17.
105. Hassler, C. Polymers for neural implants. / C. Hassler, T. Boretius, T. Stieglitz // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. – 2011. – V. 49(1). – P. 18-33.
106. Nair, L. S. Biodegradable polymers as biomaterials. / L. S. Nair, C. T. Laurencin // *Progress in Polymer Science*. – 2007. – V. 32(8-9). – P. 762-798.
107. Cipitria, A. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds – a review. / A. Cipitria, A. Skelton, T. R. Dargaville, P. D. Dalton, D. W. Hutmacher // *Journal of Materials Chemistry*. – 2011. – V. 21(26). – P. 9419-9453.

108. Gonçalves, C. Poly(lactic acid) composites containing carbon-based nanomaterials: a review. / C. Gonçalves, I. C. Gonçalves, F. D. Magalhães, A. M. Pinto // *Polymers*. – 2017. – V. 9(7). – A. 269.
109. Guan, J. Biodegradable elastomeric scaffolds with basic fibroblast growth factor release. / J. Guan, J. J. Stankus, W. R. Wagner // *Journal of Controlled Release*. – 2007. – V. 120(1-2). – P. 70-78.
110. Liaw, D.-J. Advanced polyimide materials: syntheses, physical properties and applications. / D.-J. Liaw, K.-L. Wang, Y.-C. Huang, K.-R. Lee, J.-Y. Lai, C.-S. Ha // *Progress in Polymer Science*. – 2012. – V. 37(7). – P. 907-974.
111. Hasegawa, M. Photophysics, photochemistry, and optical properties of polyimides. / M. Hasegawa, K. Horie // *Progress in Polymer Science*. – 2001. – V. 26(2). – P. 259-335.
112. Stieglitz, T. Manufacturing, assembling and packaging of miniaturized neural implants. / T. Stieglitz // *Microsystem Technologies*. – 2010. – V. 16(5). – P. 723-734.
113. Lacour, S. P. Materials and technologies for soft implantable neuroprostheses. / S. P. Lacour, G. Courtine, J. Guck // *Nature Reviews Materials*. – 2016. – V. 1. – A. 16063.
114. Larin, S. V. Multiscale modeling of electrical conductivity of R-BAPB polyimide + carbon nanotubes nanocomposites. / S. V. Larin, S. V. Lyulin, P. A. Likhomanova, K. Yu. Khromov, A. A. Knizhnik, B. V. Potapkin // *Computational Materials Science*. – 2020. – V. 180. – A. 109695.
115. Zhai, Y. Conductive polymer composites with low percolation thresholds for flexible and stretchable electronics. / Y. Zhai, Z. Wang, G. Kwon, Z. Cai, D. J. Lipomi // *Accounts of Chemical Research*. – 2021. – V. 54(11). – P. 2529-2541.
116. Won, S. M. Emerging modalities and implantable technologies for neuromodulation. / S. M. Won, E. Song, J. T. Reeder, J. A. Rogers // *Cell*. – 2020. – V. 181(1). – P. 115-135.
117. Liu, Z. Electroactive Biomaterials and Systems for Cell Fate Determination and Tissue Regeneration: Design and Applications. / Z. Liu, X. Wan, Z. L. Wang, L. Li // *Advanced Materials*. – 2021. – V. 33(32). – A. e2007429.

118. Geim, A. K. The rise of graphene. / A. K. Geim, K. S. Novoselov // *Nature Materials*. – 2007. – V. 6. – P. 183-191.
119. Ku, S. H. Myoblast differentiation on graphene oxide. / S. H. Ku, C. B. Park // *Biomaterials*. – 2013. – V. 34. – P. 2017-2023.
120. Grayfer, E. D. Graphene: chemical approaches to the synthesis and modification. / E. D. Grayfer, V. G. Makotchenko, A. S. Nazarov, S. J. Kim, V. E. Fedorov // *Russian Chemical Reviews*. – 2011. – V. 80(8). – P. 727-749.
121. Gao, C. Graphene networks with low percolation threshold in ABS nanocomposites: selective localization and electrical and rheological properties. / C. Gao, S. Zhang, F. Wang, B. Wen, C. Han, Y. Ding, M. Yang // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2014. – V. 6(15). – P. 12252-12260.
122. Раков, Э. Г. Углеродные нанотрубки в новых материалах. / Э. Г. Раков // *Успехи химии*. – 2013. – Т. 82(1). – С. 27-47.
123. Mori, H. Dense carbon-nanotube coating scaffolds stimulate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. / H. Mori, Y. Ogura, K. Enomoto, M. Hara, G. Maurstad, B. T. Stokke, S. Kitamura // *PLoS One*. – 2020. – V. 15(1). – A. e0225589.
124. Taniguchi, N. Effect of pore size on bone ingrowth into porous titanium implants fabricated by additive manufacturing: An in vivo experiment. / N. Taniguchi, S. Fujibayashi, M. Takemoto, K. Sasaki, B. Otsuki, T. Nakamura, T. Matsushita, T. Kokubo, S. Matsuda // *Materials Science and Engineering: C*. – 2016. – V. 59. – P. 690-701.
125. Dykman, L. A. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. / L. A. Dykman, N. G. Khlebtsov // *Chemical Society Reviews*. – 2012. – V. 41. – P. 2256-2282.
126. Jain, P. K. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. / P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed // *Plasmonics*. – 2007. – V. 2. – P. 107-118.

127. Baei, P. Electrically conductive gold nanoparticle-chitosan thermosensitive hydrogels for cardiac tissue engineering. / P. Baei, S. Jalili-Firoozinezhad, S. Rajabi-Zeleti, M. Tafazzoli-Shadpour, H. Baharvand, N. Aghdami // *Materials Science and Engineering: C*. – 2016. – V. 63. – P. 131-141.
128. Dhivya, S. Metallic Nanomaterials for Bone Tissue Engineering. / S. Dhivya, J. Ajita, N. Selvamurugan // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. – 2015. – V. 11(10). – P. 1675-1700.
129. Guimard, N. K. Conducting polymers in biomedical engineering. / N. K. Guimard, N. Gomez, C. E. Schmidt // *Progress in Polymer Science*. – 2007. – V. 32. – P. 876-921.
130. Park, Y. Research Progress on Conducting Polymer-Based Biomedical Applications. / Y. Park, J. Jung, M. Chang // *Applied Sciences*. – 2019. – V. 9(6). – A. 1070.
131. Le, T.-H. Electrical and Electrochemical Properties of Conducting Polymers. / T.-H. Le, Y. Kim, H. Yoon // *Polymers*. – 2017. – V. 9(4). – A. 150.
132. Rahaman, M. A New Insight in Determining the Percolation Threshold of Electrical Conductivity for Extrinsicly Conducting Polymer Composites through Different Sigmoidal Models. / M. Rahaman, A. Aldalbahi, P. Govindasami, N. P. Khanam, S. Bhandari, P. Feng, T. Altalhi // *Polymers*. – 2017. – V. 9(10). – A. 527.
133. Bauhofer, W. A review and analysis of electrical percolation in carbon nanotube polymer composites. / W. Bauhofer, J. Z. Kovacs // *Composites Science and Technology*. – 2009. – V. 69(10). – P. 1486-1498.
134. Marsden, A. J. Electrical percolation in graphene-polymer composites. / A. J. Marsden, D. G. Papageorgiou, C. Vallés, A. Liscio, V. Palermo, M. A. Bissett, R. J. Young, I. A. Kinloch // *2D Materials*. – 2018. – V. 5(3). – A. 032003.
135. Ambrosetti, G. Percolation-to-hopping crossover in conductor-insulator composites. / G. Ambrosetti, I. Balberg, C. Grimaldi // *Physical Review B*. – 2010. – V. 82(13). – A. 134201.

136. Newbold, C. Changes in biphasic electrode impedance with protein adsorption and cell growth. / C. Newbold, R. Richardson, R. Millard, C. Huang, D. Milojevic, R. Shepherd, R. Cowan // *Journal of Neural Engineering*. – 2010. – V. 7(5). – A. 056011.
137. Shin, Y. Low-impedance tissue-device interface using homogeneously conductive hydrogels chemically bonded to stretchable bioelectronics. / Y. Shin, H. S. Lee, Y. J. Hong, S. H. Sunwoo, O. K. Park, S. H. Choi, D.-H. Kim, S. Lee // *Science Advances*. – 2024. – V. 10(12). – A. eadi7724.
138. Sudwilai, T. Polypyrrole-coated electrospun poly(lactic acid) fibrous scaffold: effects of coating on electrical conductivity and neural cell growth. / T. Sudwilai, J. J. Ng, C. Boonkrai, N. Israsena, S. Chuangchote, P. Supaphol // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2014. – V. 25(12). – P. 1240-1252.
139. Reznickova, A. Gold nanoparticles deposited on glass: physicochemical characterization and cytocompatibility. / A. Reznickova, Z. Novotna, N. Slepickova Kasalkova, V. Svorcik // *Nanoscale Research Letters*. – 2013. – V. 8(1). – A. 252.
140. Gajendiran, M. Conductive biomaterials for tissue engineering applications. / M. Gajendiran, J. Choi, S.-J. Kim, K. Kim, H. Shin, H.-J. Koo, K. Kim // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. – 2017. – V. 51. – P. 12-26.
141. Ou, L. Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. / L. Ou, B. Song, H. Liang, J. Liu, X. Feng, B. Deng, T. Sun, L. Shao // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2016. – V. 13. – A. 57.
142. Luan, B. Potential toxicity of graphene to cell functions via disrupting protein-protein interactions. / B. Luan, T. Huynh, L. Zhao, R. Zhou // *ACS Nano*. – 2015. – V. 9(1). – P. 663-669.
143. Lam, C. W. Toxicologic review of carbon nanotubes. / C. W. Lam, J. T. James, R. McCluskey, S. Arepalli, R. L. Hunter // *Critical Reviews in Toxicology*. – 2006. – V. 36(3). – P. 189-217.
144. Yang, S.-T. Carbon Dots for Optical Imaging in Vivo. / S.-T. Yang, L. Cao, P. G. Luo, F. Lu, X. Wang, H. Wang, M. J. Mezziani, Y. Liu, G. Qi, Y.-P. Sun // *Journal of the American Chemical Society*. – 2009. – V. 131(32). – P. 11308-11309.

145. Liu, W. Zebrafish: A Promising Model for Evaluating the Toxicity of Carbon Dot-Based Nanomaterials. / W. Liu, G. Huang, X. Su, S. Li, Q. Wang, Y. Zhao, Y. Liu, J. Luo, Y. Li, C. Li, D. Yuan, H. Hong, X. Chen, T. Chen // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2020. – V. 12(43). – P. 49012-49020.
146. Huang, X. Effect of injection routes on the biodistribution, clearance, and tumor uptake of carbon dots. / X. Huang, F. Zhang, L. Zhu, K. Y. Choi, N. Guo, J. Guo, K. Tackett, P. Anilkumar, G. Liu, Q. Quan, H. S. Choi, G. Niu, Y.-P. Sun, S. Lee, X. Chen // *ACS Nano*. – 2013. – V. 7(7). – P. 5684-5693.
147. Mendonça, A. C. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. / A. C. Mendonça, C. H. Barbieri, N. Mazzer // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2003. – V. 129(2). – P. 183-190.
148. Li, L. Direct-current electrical field guides neuronal stem/progenitor cell migration. / L. Li, Y. H. El-Hayek, B. Liu, Y. Chen, E. Gomez, X. Wu, K. Ning, L. Li, N. Chang, L. Zhang, Z. Wang, X. Hu, Q. Wan // *Stem Cells*. – 2008. – V. 26(8). – P. 2193-2200.
149. Oezkucur, N. Electrical field-induced cell guidance and growth are mediated by reactive oxygen species and phosphoinositide 3-kinase signaling. / N. Oezkucur, T. K. Monsees, S. Perike, H. Q. Do, R. H. W. Funk // *PLoS One*. – 2009. – V. 4. – A. e6131.
150. Zhu, B. Large-scale neuronal differentiation of human neural stem cells guided by conductive polymer substrates. / B. Zhu, S.-C. Luo, H. Zhao, H.-A. Lin, J. Sekine, A. Nakao, C. Chen, Y. Yamashita, H.-H. Yu // *Nature Communications*. – 2014. – V. 5. – A. 4523.
151. Latchoumane, C.-F. V. Chronic electrical stimulation promotes functional maturation of human neural stem cells. / C.-F. V. Latchoumane, L. Jackson, M. S. E. Sendi, K. F. Tehrani, L. J. Mortensen, S. L. Stice, M. Ghovanloo, L. Karumbaiah // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8. – A. 10957.
152. Bologna, L. L. Low-frequency stimulation enhances burst activity in cortical cultures during development. / L. L. Bologna, T. Nieus, M. Tedesco, M. Chiappalone, F. Benfenati, S. Martinoia // *Neuroscience*. – 2010. – V. 165(3). – P. 692-704.

153. Ercan, B. The effect of biphasic electrical stimulation on osteoblast function at anodized nanotubular titanium surfaces. / B. Ercan, T. J. Webster // *Biomaterials*. – 2010. – V. 31(13). – P. 3684-3693.
154. Brighton, C. T. A multicenter study of the treatment of non-union with constant direct current. / C. T. Brighton, J. Black, Z. B. Friedenberg, J. L. Esterhai, L. J. Day, J. F. Connolly // *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*. – 1981. – V. 63(1). – P. 2-13.
155. Cheah, Y. J. Wound Healing with Electrical Stimulation Technologies: A Review. / Y. J. Cheah, M. R. Buyong, M. H. Mohd Yunus // *Polymers*. – 2021. – V. 13(21). – A. 3790.
156. Scheiner, A. Imbalanced biphasic electrical stimulation: muscle tissue damage. / A. Scheiner, J. T. Mortimer, U. Roessmann // *Annals of Biomedical Engineering*. – 1990. – V. 18(4). – P. 407-425.
157. Kawasaki, L. The mechanisms and evidence of efficacy of electrical stimulation for healing of pressure ulcer: a systematic review. / L. Kawasaki, V. K. Mushahwar, C. Ho, S. P. Dukelow, L. L. H. Chan, K. M. Chan // *Wound Repair and Regeneration*. – 2014. – V. 22(2). – P. 161-173.
158. Dagdeviren, C. Energy harvesting from the animal/human body for self-powered electronics. / C. Dagdeviren, Z. Li, Z. L. Wang // *Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2017. – V. 19. – P. 85-108.
159. Imae, I. Self-doped conducting polymers in biomedical engineering: Synthesis, characterization, current applications and perspectives. / I. Imae, K. Krukiewicz // *Bioelectrochemistry*. – 2022. – V. 146. – A. 108127.
160. Novoselov, K. S. Electric field effect in atomically thin carbon films. / K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov // *Science*. – 2004. – V. 306(5696). – P. 666-669.
161. Gonçalves, M. M. Two Decades of Nanotoxicology: Evolution, Impact, and Future Challenges. / M. M. Gonçalves, I. J. B. Santos, T. V. de Oliveira, A. P. Madureira, K. P. Correa, M. S. de Sousa, B. M. A. C. Mesquita, J. S. D. R. Coimbra // *ACS Omega*. – 2026. – V. 11(35). – P. 52289-52311.

162. Park, J. Electrically Active Biomaterials for Stimulation and Regeneration in Tissue Engineering. / J. Park, G. E. Akbaba, N. Sharma, R. Das, T. Vinikoor, Y. Liu, D. Q. Le, K. Angadi, T. D. Nguyen // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2025. – V. 113(1). – A. e37871.
163. Farjaminejad, R. Advances and Challenges in Tissue Engineering: Biomaterials, Cellular Strategies, and Clinical Applications. / R. Farjaminejad, S. Farjaminejad, F. Garcia-Godoy, A. Marya, L. Nucci, A. Jamilian // *Journal of Functional Biomaterials*. – 2026. – V. 17(4). – A. 184.
164. Zimmermann, J. Electrical stimulation for cartilage tissue engineering - A critical review from an engineer's perspective. / J. Zimmermann, A. R. Farooqi, U. van Rienen // *Heliyon*. – 2024. – V. 10(19). – A. e38112.
165. Vaganov, G. Development of new polyimide powder for selective laser sintering. / G. Vaganov, A. Didenko, E. Ivan'kova, E. Popova, V. Yudin, V. Elokhovskii, I. Lasota // *Journal of Materials Research*. – 2019. – V. 34. – P. 2895-2902.
166. Levin, M. Molecular bioelectricity: how endogenous voltage potentials control cell behavior and instruct pattern regulation in vivo. / M. Levin // *Molecular Biology of the Cell*. – 2014. – V. 25(24). – P. 3835-3850.
167. Cooper, G. M. Transport of Small Molecules. / G. M. Cooper // *The Cell: A Molecular Approach*. – 2nd ed. – Sunderland: Sinauer Associates, 2000.
168. Chen, C. Electrical stimulation as a novel tool for regulating cell behavior in tissue engineering. / C. Chen, X. Bai, Y. Ding, I.-S. Lee // *Biomaterials Research*. – 2019. – V. 23. – A. 25.
169. Gittens, R. A. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. / R. A. Gittens, T. McLachlan, R. Olivares-Navarrete, Y. Cai, S. Berner, R. Tannenbaum, Z. Schwartz, K. H. Sandhage, B. D. Boyan // *Biomaterials*. – 2011. – V. 32(13). – P. 3395-3403.
170. Nuccitelli, R. A role for endogenous electric fields in wound healing. / R. Nuccitelli // *Current Topics in Developmental Biology*. – 2003. – V. 58. – P. 1-26.
171. Kho, D. Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. / D. Kho, C. MacDonald,

- R. Johnson, C. P. Unsworth, S. J. O'Carroll, E. Du Mez, C. E. Angel, E. S. Graham // *Biosensors*. – 2015. – V. 5(2). – P. 199-222.
172. Hallab, N. J. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. / N. J. Hallab, K. J. Bundy, K. O'Connor, R. L. Moses, J. J. Jacobs // *Tissue Engineering*. – 2001. – V. 7(1). – P. 55-71.
173. Migita, S. Sub-micrometer scale surface roughness of titanium reduces fibroblasts function. / S. Migita, S. Okuyama, K. Araki // *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*. – 2016. – V. 14(1). – P. e65-e69.
174. Saberi, A. Electrically conductive materials: opportunities and challenges in tissue engineering. / A. Saberi, F. Jabbari, P. Zarrintaj, M. R. Saeb, M. Mozafari // *Biomolecules*. – 2019. – V. 9(9). – A. 448.
175. Al-Azzam, N. Micropatterning of cells via adjusting surface wettability using plasma treatment and graphene oxide deposition. / N. Al-Azzam, A. Alazzam // *PLoS ONE*. – 2022. – V. 17(6). – A. e0269914.
176. Luo, J. The influence of nanotopography on cell behaviour through interactions with the extracellular matrix – a review. / J. Luo, M. Walker, Y. Xiao, H. Donnelly, M. J. Dalby, M. Salmeron-Sanchez // *Bioactive Materials*. – 2022. – V. 15. – P. 145-159.
177. Borisova, M. E. Effect of the degree of crystallinity on charge relaxation in a polyimide. / M. E. Borisova, A. M. Kamalov, V. E. Smirnova, V. E. Yudin // *Polymer Science, Series A*. – 2018. – V. 60(3). – P. 278-283.
178. Yoonessi, M. Fabrication of graphene-polyimide nanocomposites with superior electrical conductivity. / M. Yoonessi, J. R. Gaier, M. Sahimi, T. L. Daulton, R. B. Kaner, M. A. Meador // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2017. – V. 9(49). – P. 43230-43238.
179. Колбе, К. А. Электростимуляция дермальных фибробластов человека на электропроводящей матрице. / К. А. Колбе, М. А. Шишов, И. Ю. Сапурина, Н. В. Смирнова, В. В. Кодолова-Чухонцева, Е. Н. Дресвянина, А. М. Камалов, В. Е. Юдин // *Журнал технической физики*. – 2021. – Т. 91(12). – С. 2059-2066.

180. Kamalov, A. Influence of Electric Field on Proliferation Activity of Human Dermal Fibroblasts. / A. Kamalov, M. Shishov, N. Smirnova, V. Kodolova-Chukhontseva, I. Dobrovol'skaya, K. Kolbe, A. Didenko, E. Ivan'kova, V. Yudin, P. Morganti // Journal of Functional Biomaterials. – 2022. – V. 13(3). – A. 89.
181. Kodolova-Chukhontseva, V. V. Conducting Composite Material Based on Chitosan and Single-Wall Carbon Nanotubes for Cellular Technologies. / V. V. Kodolova-Chukhontseva, M. A. Shishov, K. A. Kolbe, N. V. Smirnova, I. P. Dobrovol'skaya, E. N. Dresvyanina, S. G. Bystrov, N. S. Terebova, A. M. Kamalov, A. E. Bursian, E. M. Ivan'kova, V. E. Yudin // Polymers. – 2022. – V. 14(16). – A. 3287.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю – г.н.с. филиала НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ – ИВС, д.ф.-м.н. Юдину Владимиру Евгеньевичу за научное руководство и поддержку при выполнении диссертационного исследования.

Автор выражает искреннюю признательность к.б.н. Смирновой Наталье Владимировне за постоянную помощь и поддержку при выполнении работы, участие в планировании экспериментов, обсуждении результатов, а также за внимательное отношение, терпение и ценные рекомендации на всех этапах исследования.

Автор благодарит к.т.н. Шишова Михаила Александровича за проектирование и изготовление ячейки для электростимуляции, а также за помощь в проведении экспериментов по электрической стимуляции клеточных культур.

Автор выражает благодарность к.т.н. Камалову Алмазу Маратовичу за проведение электрофизических исследований и помощь в интерпретации электрических характеристик полученных композиционных материалов.

Автор благодарит к.х.н. Диденко Андрея Леонидовича, д.т.н. Кодолову-Чухонцеву Веру Владимировну и д.х.н. Сапурину Ирину Юрьевну за помощь в синтезе материалов, консультации по вопросам получения и модификации полимерных композитов, а также за обсуждение результатов исследования.

Автор выражает благодарность коллективу лаборатории № 8 «Механики полимеров и композиционных материалов» филиала НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ – ИВС за помощь на различных этапах экспериментальной работы, консультации, плодотворные обсуждения и поддержку при выполнении диссертационного исследования.

Автор также благодарит сотрудников лаборатории «Нейрохимии» ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» за помощь в организации и проведении под руководством д.б.н. Карпенко Марины Николаевны экспериментов *in vivo* по исследованию влияния электростимуляции на заживление кожных ран.