

УДК 57.089.002.3;57.089:616-7].002.3, 616-001.4/.6, 616.8-089
УКПП
№ держреєстрації 0122U000775
Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет (СумДУ)
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2, (0542) 334108

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
д-р фіз.-мат. наук, професор

_____ А.М. Черноус

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ
Фізико-хімічні аспекти формування композитного наноструктурованого біорозкладного матеріалу для лікування ушкоджених периферичних нервів

СИНТЕЗ ТА ВИВЧЕННЯ ОСНОВ ФОРМУВАННЯ
НАНОСТРУКТУРОВАНИХ НЕРВОВИХ ПРОВІДНИКІВ НА ОСНОВІ
БІОМАТЕРІАЛІВ, МОДИФІКОВАНИХ НАНОЧАСТИНКАМИ
НЕОРГАНІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ
(проміжний)

Керівник НДР,
чл.-кор. НАНУ, д-р фіз.-мат. наук

Л.Ф. Суходуб

2022

Рукопис закінчено 18 грудня 2022 р.

Результати роботи розглянуті науковою радою СумДУ протокол від __ грудня 2022р. № __

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, Завідувач кафедри ББФБІ чл.-кор. НАНУ, д-р. фіз.-мат. наук, професор	18.12.2022	Л.Ф.Суходуб (розділи 1,2 висновки)
Відповідальний виконавець Старш. наук. співроб. лабораторії «Біонаноккомпозит» кафедри ББФБІ, канд. хім. наук.	18.12.2022	Л.Б. Суходуб (вступ, розділ 1,2, висновки)
Виконавці: Мол. наук. Співроб. лабораторії «Біонаноккомпозит» кафедри ББФБІ	18.12.2022	М.О.Кумеда (розділ 2,3)
Студент кафедри наноелектроніки та модифікації поверхні	18.12.2022	О. Шевель (розділ 3)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 58 с., 10 рис., 3 табл., 128 джерел.

АЛЬГІНАТ, ВУГЛЕЦЕВІ НАНОЧАСТИНКИ, ГІБРИДНИЙ КОМПОЗИТ, НЕРВОВИЙ ПРОВІДНИК, ФІЗИКО-БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ, ХІТОЗАН

Об'єкт дослідження: процеси структурно-фазових особливостей формування мультикомпонентних біорозкладних матеріалів для використання в практичній нейрохірургії, їх фізичні властивості: анізотропність структури, міжмолекулярні взаємодії, кінетика вивільнення лікарських препаратів *in vitro* у модельне середовище.

Мета роботи – встановлення фізико-хімічних закономірностей утворення біорозкладних композитних нервових провідників, модифікованих компонентами різного походження (карбонові наночастинки, біологічно-активні речовини, протеїни, лікарські засоби) у формі трубок або пластин та закладення фундаментальної бази для технологічних основ створення біоматеріалів з заданими функціональними характеристиками.

Зроблено наступне:

Проведено теоретичне планування синтезу базової моделі наноструктурованих нервових провідників на основі біополімерів, модифікованих наночастинками неорганічного походження (хітозан, альгінат), в т.ч. з вмістом вуглецевих наночастинок (фулерен С60, одностінні вуглецеві нанотрубки); здійснена теоретична розробка лабораторної технологічної оснастки для формування кондуїтів; доведено, що вуглецеві наночастинки знижують ступінь набрякання синтезованих матеріалів, а додавання одностінних вуглецевих нанотрубок вдвічі покращує електропровідні характеристики порівняно з фулереном С60; уперше розроблено лабораторні методики отримання біорозкладних наноструктурованих композитів, потенційно придатних для лікування ушкоджених периферичних нервів.

Оприлюднення і апробація результатів.

За результатами НДР у 2022 році було опубліковано 1 статтю у науковому виданні Q2, проіндексованому БД Scopus та WOS; 1 статтю в науковому фаховому виданні України, проіндексованому БД Scopus; 2 розділи монографії у закордонному виданні англійською мовою; результати оприлюднені у вигляді тез на 3 міжнародних наукових конференціях та впроваджені в навчальний процес.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	6
ВСТУП	8
1 Вивчення основ формування структурної базової моделі нанокompозитних нервових провідників з вмістом частинок неорганічного походження (гідроксиапатиту, оксидів металів)	12
1.1 Світовий доробок щодо наукових розробок молекулярних систем нервових провідників з компонентами нанометричного розміру	12
1.2 Теоретичне планування синтезу базової моделі на основі біополімерів, модифікованих наночастинками неорганічного походження	19
2 Вивчення основ формування структурної моделі нанокompозитних нервових провідників з вмістом вуглецевих наночастинок	34
2.1 Огляд світової наукової літератури щодо методик синтезу наноструктурованого матеріалу для нервових провідників	34
2.2 Перспективи застосування вуглецевих наночастинок при створенні біоматеріалів	36
2.3 Основи формування наноструктурованого матеріалу для нервових провідників на основі біополімерів (хітозан, альгінат) з вмістом вуглецевих наночастинок (фулерен C ₆₀ , одностінні вуглецеві нанотрубки, SWNTs).....	38
3 Теоретична розробка моделі технологічної оснастки для формування кондуїтів трубчастої форми. Попередні фізико-біологічні дослідження біосумісності матеріалів <i>in vitro</i>	40
3.1 Теоретична схема пристрою для синтезу нервових провідників.....	40
3.2 Результати фізико-біологічних досліджень біосумісності матеріалів <i>in vitro</i>	41
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ	47

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

ГК - гібридний композит
БМ – біоматеріали
ОСР - октакальцій фосфатної
ОФК- ортофосфати кальцію
НА (ГА) – гідроксиapatит
кдНА – кальцій дефіцитний гідроксиapatит
DCPD - брушит
DCPA - монетит
СРР -кальцій пірофосфат
MWCNTs- багатостінні вуглецеві нанотрубки
SWNTs – одностінні вуглецеві нанотрубки
ВНЧ - вуглецеві наночастинки
ВНТ - вуглецеві нанотрубки
PLA - полілактид
Alg – альгінат
CS – хітозан
PBS – фосфатний буферний розчин
SBF – модельний фізіологічний розчин
ПЕМ – просвічуюча електронна мікроскопія
XRD – рентгенівська дифракція
ТЕМ – растрова електронна мікроскопія
УЗ – ультразвукове випромінювання
РФА, RFA – рентгено-флуоресцентний аналіз
МХО – мікрохвильове випромінювання
УПН - ушкодження периферичних нервів
НП- нервові провідники
ПНС - Периферична нервова система
РПН -Регенерація периферичних нервів

АНП - аутонейропластика

ФЛ - фотолюмінісценція

Sw - ступінь набрякання

МБцК – мінімальна бактерицидна концентрація

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

ВСТУП

Нервова система є важливою частиною людського організму. Викликані травмами ушкодження периферичних нервів (УПН) спричинюють різні функціональні розлади. Відновлення та регенерація периферичних нервів залишається однією з найбільших проблем у тканинній інженерії та регенеративній медицині. Не дивлячись на постійну еволюцію в даній галузі, оптимального рішення проблеми на сьогодні не існує. Функціоналізовані нейротрубки – це канали третього покоління з хімічною або архітектурною біоактивністю, розроблені для проліферації аксонів. Завдяки вдосконаленню біоінженерії та мікрохірургії, в перспективі нейротрубки можуть підвищити рівень регенерації та функціонального відновлення критичного нервового розриву. В той же час бракує досліджень, які б показали, що результати трансплантації нервової трубки були кращими, ніж результати трансплантації аутологічного нерва [5]. Основуючись на нейробиологічних знаннях про події, які відбуваються після пошкодження нерва, стверджується, що життєздатність нейронів залежить від ідеального комплексу факторів росту, гормонів, цитокінів і факторів позаклітинного матриксу. В ідеалі штучний нервовий провідник має діяти як фізичний бар'єр від оточуючого середовища та одночасно бути фізичним орієнтиром для регенеративних аксонів. Нервові провідники також мають утримувати природним чином вивільнені фактори росту нервів, що виділяються пошкодженими нервовими куксами, а також зменшувати інвазію фібробластів, що утворюють рубцеву тканину біля місця пошкодження. Комбінований підхід до створення штучних багатофункціональних нервових провідників покращить та прискорить досягнення функціональних та клінічних результатів після травми периферичного нерву [6].

Регенерація периферичних нервів (РПН) залежить від реконструкції локального регенераційного мікрооточення [7]. Мікрооточення містить ключові чинники нейронної регенерації: імунну відповідь,

внутрішньонейральну васкуляризацію, біоенергетичний метаболізм і біоелектричну провідність [8]. Функціональна оцінка, обрана для визначення статусу відновлення, залежить від обраної моделі тварин, функцій, які контролює пошкоджений нерв, і бажаних вимірювань. Дослідження часто включають тести для визначення ступеня розвитку, що відбулося під час відновлення, за допомогою гістології та морфології [9]. В якості нервових провідників (НП) здебільшого використовують ауто- та алотрансплантати, ксенотрансплантати та штучні полімерні матеріали. Операцією вибору у пацієнтів з великими дефектами нервів протягом близько п'ятдесяти останніх років залишається “золотий стандарт” – аутонейропластика [10]. *Аутоотрансплантати* — це сегменти тканини самого пацієнта, які хірургічним шляхом видаляються з іншої ділянки тіла та імплантуються в місце пошкодження, щоб закрити розрив пошкодженої тканини [11]. Нервові аутоотрансплантати забезпечують ідеальну заміну тканини, оскільки вони повторюють рідну тканину хімічно, біологічно та структурно. Як правило, для дослідження РПН використовують пошкоджені сегменти ікроножного нерва [12]. При відновленні нерва спостерігається краща регенерація та функціональне відновлення при застосуванні подібного йому типу нерва, наприклад, використання донорського моторного нейрона для відновлення пошкодженого моторного нейрона [13]. В той же час застосування аутоотрансплантатів можуть супроводжуватись проблемами колапсу, перегинів, захворюваності донорської ділянки, невідповідності ендоневральної та фасцикулярної трубок і відсутності нейротрофічних факторів [14].

Ненейрональні аутоотрансплантати, а саме короткі сегменти кровоносних судин з м'язовою тканиною (м'язи у венних трансплантатах) також використовувалися у місцях нервового розриву [15]. Незважаючи на те, що вони є джерелом аутологічної тканини, яка не призводить до сенсорних/рухових захворювань через збирання нервової тканини, нервові аутоотрансплантати продовжують перевершувати їх у відновленні нервів. Не

нейрональні алотрансплантати також досліджували в якості потенційних кондуктних пристроїв для відновлення периферичних нервів [16]. Однак вони також поступаються нервовим аутоотрансплантатам, і наразі наявна обмежена кількість клінічних даних з їх використання.

Нервові алотрансплантати, які є тканинними трансплантатами, ізольованими від трупів, і теоретично мають перевагу відповідно розміру та типу нейрона (моторної/сенсорної) специфічності реципієнта, були запропоновані та досліджені в якості альтернативи [17]. Нервові алотрансплантати містять ендоневріальні мікроструктури, необхідні для полегшення регенерації нервів, є потенційним джерелом життєздатних клітин Шванна і продемонстрували досить гарне відновлення порівнянно з нервовими аутоотрансплантатами [17]. Алотрансплантація тканин, у тому числі нервових, потребує системної імуносупресії, щоб обмежити ризик потенційного відторгнення системою господаря. Небезпека для здоров'я та вразливість серйозно обмежують широке використання нервових алотрансплантатів [18]. Щоб зменшити імуногенність алотрансплантата проводять децелюляризацію для видалення клітинних компонентів [19].

Останні досягнення в медицині та імунології привели до кількох методів обмеження антигенності та ризику відторгнення алотрансплантатів, включаючи опромінення, заморожування та ліофілізацію [19]. Використання алотрансплантатів залежить від життєздатності клітин Шванна-господаря та донора, причому нативні та трансплантовані клітини Шванна відповідають за правильну ремієлінізацію та діють як джерело нейротрофічних факторів. Існує дослідницький інтерес у біомедичних та біологічних галузях щодо розуміння реакції пацієнта на трансплантацію нервового алотрансплантата, щоб з'ясувати механізми та методи пом'якшення таких реакцій [9].

Ксенотрансплантати (сегменти нервів тварин) є альтернативою людським трансплантатам. Перевагою ксенотрансплантатів є більша доступність і менша вартість порівняно з алотрансплантатами людини, однак наразі немає офіційно схвалених, відповідних до алотрансплантатів, якісних

матеріалів тваринного походження для відновлення периферичних нервів. Не зважаючи на це, ксеногенні матеріали широко використовуються в РПН. Алотрансплантація та ксенотрансплантація вимагають застосування тривалої імуносупресивної терапії, є високий ризик контамінації та вторинного інфікування [20].

Нервові провідники (НП) є альтернативою трансплантованим тканинам і можуть бути виготовлені з біологічних, синтетичних матеріалів або комбінації обох; вони зазвичай формуються у формі порожнистої труби. Про першу спробу використання порожнистого циліндра для УПН було повідомлено в 1881 році, коли порожнисту кістку використовували для перекриття розриву нерва в собаки [21]. За останні 40 років порожнисті моделі еволюціонували від біологічних матеріалів та силікону до більш біологічно активних і сумісних матеріалів. Матеріали раннього покоління досягли деякої регенерації нервів у сегментах з коротким проміжком, але не піддавалися біорозкладанню та потребували вторинної операції для їх видалення. Нервові кондуїти функціонують, зберігаючи градієнтну дифузію факторів росту та хемоатрактантів, які допомагають спрямувати регенерацію нерва до дистального сегменту, забезпечують захист нерва та перешкоджають інфільтрації фіброзної рубцевої тканини під час відновлення. Вони найчастіше використовуються, коли щілина пошкодженого нерва становить менше 10 мм, оскільки конструкція НП з порожнистим каналом обмежена у більш тривалому по часу відновлення розриву, і зі збільшенням часу спостерігаються гірші результати [22].

Ключові характеристики НП були визначені для покращення їх продуктивності [23]. Вони включають підтримку регенерації аксонів і проліферації та міграції гліальних клітин; відповідність механічних властивостей інкапсульованій тканині; виготовляються з біорозкладаного та біосумісного матеріалу, що дозволяє інтегрувати тканину після повної регенерації; мінімізація компресії нерва під час відновлення [11].

1. ВИВЧЕННЯ ОСНОВ ФОРМУВАННЯ СТРУКТУРНОЇ БАЗОВОЇ МОДЕЛІ НАНОКОМПОЗИТНИХ НЕРВОВИХ ПРОВІДНИКІВ З ВМІСТОМ ЧАСТИНОК НЕОРГАНІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ (ГІДРОКСИПАТИТУ, ОКСИДІВ МЕТАЛІВ)

1.1 Світовий доробок щодо наукових розробок молекулярних систем нервових провідників з компонентами нанометричного розміру

Периферична нервова система (ПНС) з'єднує головний і спинний мозок з тканинами та органами тіла людини [24]. Кожний нерв складається з кількох пучків, розміром до кількох сотень мікронів у діаметрі [25], тоді як кожний пучок містить численні аксони та клітини Шванна, які розширюють мієлінові оболонки навколо аксонів [26] (рис. 1.1). Основною структурною компонентою периферичного нерва (ПН) є шари колагенової сполучної тканини (КСТ): ендоневрій – КСТ, яка контактує з мієліною оболонкою аксонів, периневрій – захисна колагенова мембрана кожного нервового пучка і епіневрій – КСТ оболонка всієї структури нерва. Всі три мембрани пронизані кровоносними судинами.

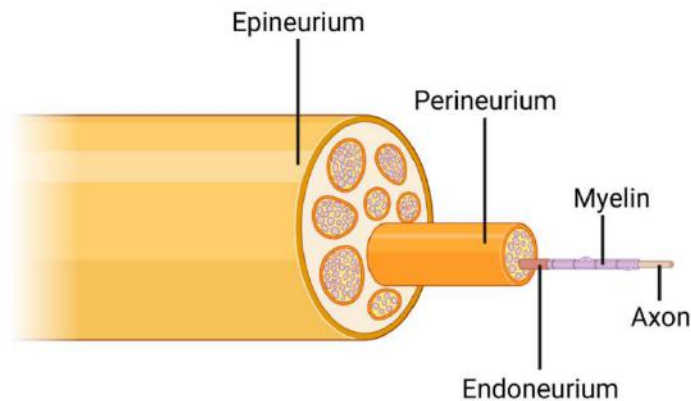


Рисунок 1.1 – Внутрішні структури периферичного нерва. Весь нерв оточений епіневрієм мембрани. Кожен пучок аксонів відокремлений від навколишньої тканини власною периневрієвою мембраною. Кожен окремих аксон разом з його мієліною оболонкою вкритий тонкою ендоневрієвою мембраною [27]

Травма є причиною 87% усіх випадків УПН [28]. Пошкодження мієлінової оболонки – найменший тип пошкодження нерва, яке відновлюється спонтанно завдяки ремієлінізації [26]. Більш серйозний тип травми – *аксонотмезис*: пошкоджені аксони піддаються так званій Wallerian дегенерації [26]. При повному перерізанні нервової тканини (*нейромезис*) з облітерацією всіх трьох колагенових мембран маємо найтяжчий тип УПН. Пошкодження периферичних нервів викликає ретроградні сигнали від аксонів до клітин, які активують експресію кількох генів регенерації [27]. Пошкодження аксону активують Schwann – клітини, які разом з макрофагами очищають шлях для його регенерації [26, 29]. Але не всі УПН заживають спонтанно: при легкому аксонотмезисі, непошкоджені ендоневрій та периневрій сприймаються Schwann – клітинами та регенеруючими аксонами, які повторюють мікроархітектуру сполучної колагенової тканини. В той же час, при тяжкому аксонотмезисі відсутність структурних колагенових мембран перешкоджає процесу відновлення, тобто виникає неорганізоване зростання (утворення хворобливого нерву) [26].

Клітинна терапія регенерації нервів на білках позаклітинного матриксу. Міжмолекулярні взаємодії рецепторів клітинної мембрани з компонентами екстра клітинного матриксу (ЕСМ) лежать в основі регенерації ПН. Рецепторами мембран, які закріплюють клітини на білках ЕСМ, є *інтегрини* – гетеродимерні макроструктури клітинної мембрани [30]. Одним із найбільш важливих білків, що входять до складу ЕСМ, є колаген, який забезпечує структурну міцність тканини на розрив. *Ламініни* – це ще одна група білків ЕСМ, які є великими за масою глікопротеїнами і саме вони утворюють основну частину ЕСМ нервової системи. *Фібронектин* також входить до нервової системи з доменом аргінін-гліцин-аспарагінова кислота (RGD), що зв'язує різні молекули інтегрину, яких налічується біля 24 типів [31]. В процесі ушкодження ПН руйнується структура колагенових мембран, що веде до ускладнень при регенерації ПНС [26]. Для вирішення цієї проблеми застосовують біоматеріали (БМ), які певним чином імітують

архітектуру ЕСМ, тобто виступають в ролі субстратів, до яких прикріплюються аксони [27]. Біоматеріали можуть бути або природними, або синтетичними. Серед природних БМ, які містять білки ЕСМ та використовуються в тканинній інженерії, включаючи ПНС, є колагенові гідрогелі, гідрогелі ламініну [32–35]. В той же час зазначені гідрогелі швидко резорбують *in vivo* та мають низьку механічну міцність [36]. До природних біополімерів включають і такі, які не входять до складу ЕСМ. Наприклад, полісахариди альгінат (Alg), або хітозан (CS), які будуть обговорені в наступних розділах звіту. Синтетичні БМ – це полімолочна кислота (PLA), полікапролактан (PCL), поліетиленгліколь (PEG) та інші. Їх властивості (пористість, жорсткість, швидкість деградації) легше «підганяти» до типу тканини у порівнянні з природними БМ [37,38]. Але в той же час, для синтетичних біополімерів необхідна певна модифікація поверхні і вони не містять інтегрин-зв'язуючих макромолекул.

Для забезпечення біорозкладного та не токсичного характеру нервових провідників застосовують природні полімери та різного виду гідрогелі. Гідрогелі являють собою природні або полімерні тривимірні водопроникні пористі мережі зі структурами, схожими до нативних нервів [39]. Гідрогелеві каркаси можуть забезпечувати механічну підтримку росту, проліферації та диференціації клітин, а їх пори сприяють дифузії поживних речовин. Механічна міцність і пористість гідрогелів є гнучкими та регульованими характеристиками, тому вони мають великі перспективи застосування в РПН [40]. Порожністі трубчасті НП (кондуїти) – це інша форма трансплантованого матеріалу для регенерації ПН. Їх виробляють з різних біоматеріалів, наприклад, колагену або PLGA [41,42]. Кондуїт служить з'єднувальним містком між куксами периферичного нерву. Він також ізолює місце ураження від навколишнього середовища та запобігає помилковій регенерації за межами проходження периферичного нерва. Але, оскільки порожнистий кондуїт не включає внутрішні периневрію та ендоневрію (рис. 1.1), то можливе дезорганізоване зростання всередині трубки. Це пояснює меншу ефективність порожнистих кондуїтів у порівнянні з

ауто трансплантатами. Було зроблено висновок, що комбінована пластика з використанням шваннівських клітин, матригелю і полілактаткапролактонових трубок є достойною альтернативою традиційній аутонейропластці (АНП) [43]. Розроблено кілька синтетичних порожнистих матриксів для тубажу нервів (Полівініл алкоголь, полігліколева кислота, колаген, полі (лактид-капролактон)). Вони є альтернативою АНП у клініці, але їх застосування обмежується дефектами розміром 3 см. Синтетичні порожнисті матрикси сприяють зменшенню інфільтрації зони шва міофібробластами та утворенню рубців і невром, гальмують колатеральний спраутинг, створюють сприятливе мікрооточення шляхом сприяння накопиченню нейротрофічних факторів. Однак, бажаного відновлення ПН у клініці неможливо досягти через відсутність у синтетичних трубках шваннівських клітин, які є регуляторами направленої росту аксонів [44]. *Клітини Шванна* відіграють важливу роль у валлерівській дегенерації. Кількість клітин Шванна після травми є у сімнадцять разів більшою, ніж у непошкодженому нерві. Даний факт є доказом того, що їх присутність є бажаною у разі травми. Тому багато методів лікування базуються на трансплантації аутологічних або алогенних клітин Шванна. Клітини Шванна походять з мігруючих клітин нервового гребеня (NCC), які мігруючи через ростральні соміти, стають клітинами Шванна та клітинами граничної кришки через ряд етапів диференціації [45]. Якщо ауто трансплантат вважають золотим стандартом відновлення периферичного нерву, то аутологічні клітини Шванна є золотим стандартом клітинної терапії. Проте ряд недоліків використання клітин Шванна (особливості зі збору, тривале розширення культури та невідповідна імуногенність) спонукали перехід на використання недиференційованих стовбурових клітин, які можуть диференціюватися на декілька типів клітин у присутності специфічних препаратів/факторів росту [46]. Для клінічного використання клітин Шванна необхідно культивувати ці клітини у великому масштабі *in vitro*. У експериментальних тварин сідничний нерв є звичайним джерелом для збирання та культивування клітин Шванна. Проте шваннівські клітини

нервового походження не є легкодоступними. Враховуючи ці обмеження, клітини Шванна нервового походження не є ідеальним джерелом для експериментальних процедур або клінічних застосувань [45,46].

Нейротрофічні фактори (GF) - це молекули, які природним чином вивільнюються в процесі травми та призводять до покращеної регенерації нервів [47]. Вони підтримують подовження аксонів і міграцію клітин Шванна, діючи як нейропротекторні компоненти через опосередковану рецепторами активацію специфічних шляхів. В основному нейротрофічні фактори належать до трьох окремих груп: нейротрофіни (NGF, BDNF, нейротрофін-3 (NT3) і нейротрофін-4 (NT4); ліганди сімейства нейротрофічних факторів, отримані з лінії гліальних клітин (GDNF) та циліарний нейротрофічний фактор (CNTF); і нейропоетичні цитокіни. Нейротрофічні фактори сімейства нейротрофінів опосередковують ефективне виживання та диференціювання кількох пов'язаних із нейронами популяцій клітин.

Ростові фактори (GF) застосовуються в якості молекулярної терапії, але цей процес є проблематичним через їх високу біологічну активність, яка передбачає введення надзвичайно малих доз. Біорозкладані БМ у цьому сенсі можуть діяти як транспортні засоби для доставки нейротрофічних факторів. При цьому варіації компонентного складу БМ дозволяють досягати бажаної швидкості та тривалого вивільнення нейротрофічних факторів. Фізичне зшивання, хімічна іммобілізація, полімерне покриття і наночастинки є одними із стратегій, які використовуються при створенні штучних НП [48].

В той же час, використання функціональних колагенових кондуїтів, об'єднаних, наприклад, з нейроцитокінами CNTF, bFGF, підвищує їх ефективність: спостерігається ефективна регенерація довгого (35 мм) нерва на моделі свині. Поєднання фібринових матриць з ростовими факторами різко збільшує кількість виживаючих стовбурових клітин у спинному мозку [49]. Фактор росту нервів (NGF) широко використовується як *in vivo*, так і *in vitro* в процесі створення БМ. Дія NGF обмежена сприянням росту периферичних симпатичних сенсорних нейронів і нейронів нервового гребеня.

Повідомляється, що з нановолокнистого каркасу, завантажений фактором росту ендотелію судин (VEGF) і NGF, останній міг безперервно вивільнятися протягом 1 місяця. NGF активує імунну відповідь, він також запускає шляхи, необхідні для пригнічення запальної відповіді, зменшуючи пошкодження тканин [50]. Було виявлено, що пошкодження периферичного нерва викликає підвищення NGF у неушкодженому нерві на протилежній його стороні [47].

Пористі скафолди є більш досконалою формою БМ у порівнянні з порожнистими трубчастими кондуїтами, про що свідчать результати тестування на УПН та SCJ (spinal cord injury) системах. Подібні скафолди виготовляються з різних полімерів, як природних, так і синтетичних; вони забезпечують кращу механічну міцність, ніж гідрогелі, разом з регулюванням періоду деградації [37]. Як і у випадку з порожнистими трубками, існує багато прикладів попереднього завантаження скафолдів гідрогелем для покращення їх біологічної активності [38,51]. Конструкції на основі волокон/ниток привертають все більшу увагу для виготовлення тривимірних складних нейронних скафолдів, оскільки структури нервової тканини включають різні типи волоконподібних клітинних вузлів [52]. У якості безперервної топографії мікро-/нановолокна або нитки можуть імітувати ультраструктуру позаклітинного матриксу та керувати розташуванням нейронних клітин. Сучасні дослідження відповідних механізмів показали, що волокна регулюють вирівнювання клітин, міграцію, проліферацію та поведінку диференціації, впливаючи на структуру актинової мережі, розподіл локальних спайок і їх розмір [53]. Наприклад, Zhang et al. [54] виготовили провідні композитні волокна з контрольованим ступенем орієнтації за допомогою електроспінінгу з різними швидкостями обертання. Композитні волокна склалися з полікапролактону (PCL) і вуглецевих нанотрубок (CNT) і мали здатність керувати орієнтованою адгезією та розростанням клітин PC12. Серед недоліків пористих скафолдів відзначимо їх неможливість відповідати, на відміну від гідрогелів, нерегулярним ділянкам враження, а також через наявність внутрішніх перегородок мікроархітектури зменшує відкритий об'єм

для регенерації аксонів [37]. Регенерація аксонів – це надзвичайно повільний (~ 1 мм/день) процес, який триває 12-18 місяців [28]. Нервові розриви в периферичному нерві більш ніж 5 мм часто не здатні бути відновлені природним шляхом [55]. Якщо всі аксони перерізані поперек, тоді відновлення залежить від оперативного втручання з використанням ауто- та алотрансплантатів [56]. Але, при цьому існують ризики внесення хвороб донорських сайтів, втрати чутливості, утворення рубців, невром та ризик імуносупресії [57]. Типові інженерні підходи зосереджені на синтетичних та біологічних кондуїтах, в основному, для нервових волокон невеликого діаметру. Оскільки функцією нейронів є проведення електричних сигналів, провідні покриття або матеріали з провідними частинками є популярним застосуванням для регенерації нервів [58]. Було доведено, що електрична стимуляція модулює вироблення фактора росту [59]. До популярних провідних часток належать вуглецеві нанотрубки або композити на основі оксиду графену [60]. Використання тимчасової електричної стимуляції (ЕС) підвищує швидкість функціонального відновлення завдяки підсиленню нервової провідності. В той же час, нервові дефекти критичного розміру вимагають використання наведених кондуїтів, а застосування ЕС в клінічних умовах є певною проблемою [61]. Альтернативою ЕС є фармакологічний підхід, а саме уповільнене вивільнення певного фармпрепарату, який сприяє провідності нервових імпульсів. Наприклад, фармпрепарат 4-амінопірідин (4AP) відомий як блокатор вольт-залежних калієвих каналів, а також як підсилювач вивільненню нейротоксину виявився придатним для лікування УПН та травм спинного мозку [62]. Здатність 4AP блокувати калієві канали є причиною сповільненої реполяризації і посилення вивільнення нейромедіаторів (рис. 2), що є ключовим фактором для використання 4AP в якості терапевтичного засобу для лікування розсіяного склерозу (MS) [63], та травм спинного мозку [64].

1.2 Теоретичне планування синтезу базової моделі на основі біополімерів, модифікованих наночастинками неорганічного походження

Серед нано- та мікрочастинок неорганічного походження, які потенційно можуть входити до складу нервових провідників, є частинки ортофосфатів кальцію (ОФК), в тому числі гідроксиапатиту (ГА), а також оксиду цинку (ZnO), магнетиту, вуглецеві наночастинки. На даному етапі виконання проекту було розроблено технологію створення кондуїтів з вмістом ОФК.

Серед всіх ОФК, дефіцитний за кальцієм гідроксиапатит (кдГА), так званий біоапатит, є основним мінеральним компонентом твердих кісткових тканин, який у поєднанні з колагеновими волокнами утворює міцну композитну наноструктуру, здатну витримувати механічні навантаження. Завдяки сайтам PO_4^{3-} і Ca^{2+} , ГА легко зв'язується з білками і тому широко використовується в біоінженерії [65]. На особливу увагу заслуговує октакальцієвий фосфат (ОСР), який є попередником нанокристалів біоапатиту завдяки своїй структурі. Ця сполука, в якій шари апатиту, паралельні площині (100), чергуються з гідратованими шарами, де найімовірніше приєднання різних іонів та молекул [66]. Гібридні органічно-неорганічні матеріали на основі тривимірної сітки біомакромолекул з включеними наночастинками ОФК набувають нових характеристик завдяки синергії функцій вихідних компонентів [67].

Існує два класи органічно-неорганічних гібридних матеріалів, компоненти яких з'єднані: і) лише слабкими міжмолекулярними взаємодіями (Н-зв'язки, Ван-дер-Ваальсові взаємодії, π - π -взаємодія або електростатичні сили); ii) міцні хімічні зв'язки (ковалентні або іон-іонні зв'язки). Крім того, компоненти, зазвичай, зближуються один до одного у масштабах менше 1 мкм [68]. Серед біомолекул хітозан (CS) є лінійним кополімером глюкозаміну та ацетилглюкозаміну, який зазвичай отримують шляхом деацетилювання хітину, полісахариду, переважно видобутого з ракоподібних кутикул. Молекула CS має три реакційноздатні групи: первинну та вторинну

гідроксильні групи та аміногрупу, що наділяє її потенційною універсальністю [69]. Одним з найважливіших завдань при створенні гібридного HA-CS матеріалу є отримання рівномірної дисперсії неорганічної фази в матриці CS [70]. Висока питома площа тривимірних пористих скафолдів є відмінним середовищем для адгезії, диференціації та проліферації клітин, які беруть участь у лікуванні ушкоджених периферичних нервів [71]. Особлива увага під час синтезу приділяється дії мікрохвильового опромінення (МХО), що може значно покращити кінетику хімічної реакції за рахунок підвищення ефективності зародження та зростання кристалів за короткий час [72,73]. Наші недавні *in vivo* дослідження показали оптимальність композиту на основі cdHA та CS у вигляді кульок для заповнення кісткових дефектів складної геометрії [74]. Ця робота мала на меті моделювання та досліджування процесу *in situ* отримання гібридного композиту, що складається з CS-матриці з включенням поліфазних ОФК з різним ступенем резорбції та його специфічної здатності до адсорбції біологічних молекули (на прикладі триптофану-Trp). Інше завдання - це дослідження впливу масового співвідношення Ca/CS та потужності МХО на фазовий склад гібридного композиту, його механічні властивості та біоактивність.

Створення технології виготовлення матеріалу – основи кондуїтів з вмістом кальцій фосфатних частинок.

Матеріали: кальцій ацетат $C_4H_6CaO_4$, Натрій дигідроортофосфат NaH_2PO_4 , натрій триполіфосфат (TPP) $Na_5P_3O_{10}$, оцтова кислота CH_3COOH (виробництво Китай); хітозан (М.М. 300 kDa, Acros organics, USA); Триптофан (М.М. 204.23, Fluka, Biochemica)

Методика. В якості вихідних розчинів готували 6% CS в 1% оцтовій кислоті, 0,5 М ацетат кальцію, 0,3 М дигідрофосфат натрію, 1% TPP. CS додавали до 0,5 М ацетату кальцію (рН 6,86) у співвідношенні Ca/CS 0,15, 0,45, 0,75 (Мас./Мас.). Суміші гомогенізували протягом 3 год (37°C, 110 об/хв), після чого сполучали з 0,3 М NaH_2PO_4 (рН 8,0). Реакцію продовжували протягом 2 год при нейтральному рН. Частина зразків піддавалась

мікрохвильовому опроміненню (МХО) (300 Вт) протягом 75 с (5×15 с), де робоча суміш досягала 60°C . Конвекційний нагрів при 60°C протягом 75 с застосовували до іншої частини зразків з тим самим співвідношенням Ca/CS. Після охолодження зразки занурювали в 1% TRP (pH 9,0). Отримані гібридні CaP/CS композити промивали дистильованою водою і сушили при 37°C . За співвідношенням Ca/CS (0,15, 0,45, 0,75) зразки, синтезовані за допомогою конвекційного нагріву, були позначені як 1C, 2C, 3C, а з використанням МХО як 1C_MW, 2C_MW, 3C_MW відповідно.

Методи. Морфологію, ступінь набрякання (Sw), міцність на стиск, фотолюмінісценцію (ФЛ) та адсорбційну здатність гібридних композитів досліджували згідно методів, описаних у передмові.

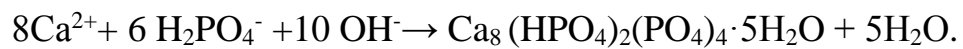
Результати:

Гібридний композит (ГК), як матеріал для використання в якості кондуїтів формувався *in situ*, у вигляді Cs-матриці з включеними в її об'єм та однорідно розподіленими полі фазними ортофосфатами кальцію, що підтверджено картографуванням даних EDX. Колоїдна суспензія містить Ca^{2+} , ацетатні іони разом з макромолекули Cs, іони H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} та PO_4^{3-} . Реакція фосфатних іонів з Ca^{2+} та функціональними групами Cs (NH_3^+ , OH^-) проводили за кислих (pH < 7) умов з метою отримання октакальційфосфату (ОСР) і інших (брушит (DCPD), кальцій дефіцитний гідроксиапатит (кдГА) ортофосфатів кальцію. ОКФ, як правило є нестабільною фазою і тому швидко трансформується в аморфний ортофосфат кальцію (АФК), який, в свою чергу, повільно перетворюється в більш стабільний ОФК - кдГА. В той же час, як показують наші дослідження, присутність в реакційному розчині макромолекул CS сприяє стабілізації певної кількості фази ОКФ. Визначено, що величина співвідношення Ca/Cs впливає на поліфазний склад ОФК.

Вплив мікрохвильового опромінення. МХО, на відміну від конвекційного термічного процесу, є більш ефективним завдяки тому, що мікрохвильова енергія (МХЕ) має прямий вплив на матеріал на молекулярному рівні [75,76]. МХЕ абсорбується матеріалом через поляризацію молекул або іонну

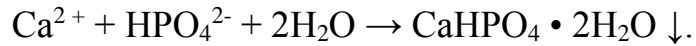
провідність. Обидва процеси спричиняють *діелектричні втрати* при певних інтервалах частот, які ведуть до об'ємного нагрівання матеріалу. Нами проведені дослідження впливу як МХО, так і конвекційного нагрівання на формування ортафосфатів кальцію.

Рентгенівська дифракція, рентгено-флюоресцентний аналіз. Реакція та умови синтезу, застосовані в даній роботі направлені, перш за все на отримання октакальцій фосфатної (ОСР) фази, однією з переваг якої є підвищена розчинність у порівнянні з стехіометричним НА, як і кдНА [77]:

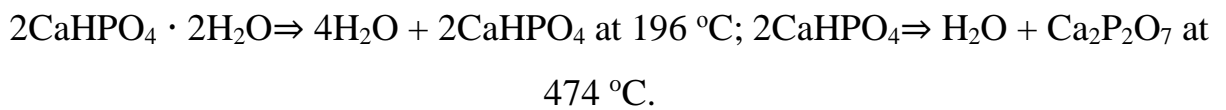


З кристалохімічної точки зору ОСР можна представити як чергування вздовж осі апатитного шару ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$), структурно подібного до НА, і гідратованого (водного) шару ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) зі структурою брушиту (DCPD). Три фосфат-іони знаходяться на стику «водного» і «апатитного» шарів. Фосфат-іон у «водному» шарі та один на стику між шарами протонуються [78]. Результати показують, що карбонат може заміщати HPO_4^{2-} у «водному» шарі або PO_4^{3-} у «апатитному» шарі, таким чином генеруючи карбонат-заміщений ОСР, який покращує вплив на регуляцію активності остеобластів у формуванні тканини [79]. Однак, присутність макромолекул хітозану з різним його співвідношенням до Ca^{2+} та застосування МХО при синтезі, очевидно, вносить певні корективи в процес нуклеації та формування фази ОСР. В цілому, ці фактори впливають на вагове співвідношення утворюваних фаз ортофосфатів кальцію після термічної обробки зразка. Для збільшення роздільної здатності піків отриманих рентгенограм, зразки були відпалені. Рентгенівські дифрактограми, зібрані з порошкоподібних зразків, синтезованих як конвекційним нагріванням, так і під впливом МХО та відпалу при 750°C протягом 1 години, представлені на рис. 1 А, Б. XRD-спектри демонструють наявність в зразках декількох фаз, а саме НА (JCPDS 9-432), ОКФ (JCPDS 01-074-1301), монетиту DCPA (JCPDS 2-1350), кальцій

пірофосфату (CPP) (JCPDS 35-0002). Брушит DCPD зазвичай утворюється шляхом змішування розчинів з іонами Ca^{2+} та HPO_4^{2-} при $\text{pH} = 3-4,5$ у такій реакції:



З підвищенням температури DCPD перетворюється в ДСРА з подальшою трансформацією в CPP згідно з реакцією [19]:



Виходячи із загальної площі відповідних піків на рентгенівських дифрактограмах, розраховували фазовий склад зразків (табл. 1, рис. 2). Оскільки піки ОСР і НА перекриваються при $2\theta \sim 30^\circ$, ці дві фази були розраховані разом. Розрахунок за формулою Шерера [80] показує, що МХО сприяє зменшенню середнього розміру кристалітів (L), (таблиця 1.1). Також, під впливом МХО та з підвищенням Ca/Cs середній вміст НА/ОСР збільшується на 5, 7, 10 мас%, а частка CPP зменшується на 13, 12 та 14% відповідно у 1С_MW, 2С_MW, 3С_MW в порівнянні до зразків, синтезованих за допомогою конвекційного нагріву. Водночас дещо збільшується вміст ДСРА. Нагрівання через МХО відбувається за рахунок діелектричних втрат, а деградація реакційних іонів сприяє швидкому утворенню більш стабільних ортофосфатів кальцію (НА, ОСР, DCPD), ніж аморфний фосфат кальцію (АСР). Відомо, що пірофосфати можуть утворюватися шляхом конденсації після нагрівання АСР, які містять HPO_4^{2-} , від 400 до 700° [81].

Ступінь набрякання отриманих матеріалів спостерігався протягом першої доби, а потім він залишався постійним. Слід зазначити, що гібридний композит, що містить CS, має відносно низьку ($< 100\%$) ступінь набрякання порівняно до інших матеріалів, які містять органічну складову. Збільшення

співвідношення Ca/Cs та ефект МХО зменшують коефіцієнти набрякання (рис. 1.2).

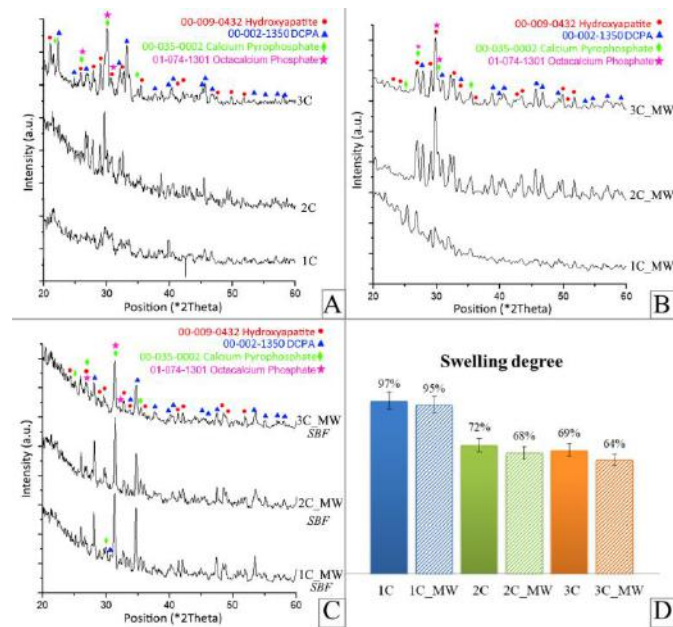


Рисунок 1.2 – Рентгенограми з відпалених при 750 °C зразків, синтезованих: А - за допомогою конвекційного нагріву; В - під впливом МХО; С - після перебування у SBF протягом 28 днів; D - ступінь набряку в SBF.

SEM/RFA та *in vitro* біоактивність. Біоактивність, яка означає здатність гібридного матеріалу взаємодіяти з навколишнім середовищем та провокувати появу та зростання ОФК *in vivo*, оцінювали після замочування зразків у SBF протягом 28 днів. Після замочування зразків у SBF (рис. 1.3, таблиця 1.1) загальний вміст неорганічної фракції збільшується на 2%, а вміст НА/ОСР збільшується на 4-7% в залежності від Ca/Cs співвідношення. Також спостерігається значне зниження DCPA у зразках 1C_MW, 2C_MW, 3C_MW на 10, 16, 24% відповідно.

SEM-мікрофотографії гібридів 3C_MW до та після їх перебування у SBF протягом 28 днів представлені на рис. 3, А, В. Наночастинки ОФК повністю поєднуються з полімерною матрицею (рис. 1.4, D). Після перебування у SBF на поверхні гібридних композитів при pH = 7,4 утворюється новий шар ОФК,

який є попередником DCPD, OCP та cdHA фаз. Цей факт підтверджує високу біоактивність отриманих композитів.

Таблиця 1.1 – Склад неорганічної кальцій фосфатної фази в досліджуваних зразках

Phase	Inorganic phase compositions after annealing at 750 °C								
	Ca/CS 0.15			Ca/CS 0.45			Ca/CS 0.75		
	CH	MW	MW after SBF	CH	MW	MW after SBF	CH	MW	MW after SBF
Total inorganic phase, wt%, where	13.16 ± 0.58	10.2 ± 0.42	12.4 ± 0.44	24.26 ± 0.98	23.7 ± 0.95	25.6 ± 1.02	34.0 ± 0.87	34.5 ± 0.95	36.1 ± 0.98
• HA/OCP	37	42	46	42	49	51	41	51	58
• DCPA	40	48	38	33	38	22	32	36	22
• CPP	23	10	16	25	13	27	27	13	29
The average size of HA crystallites (L), nm.	44.24 ± 0.50	37.27 ± 0.42	No data	37.67 ± 0.33	35.94 ± 0.47	No data	34.77 ± 0.32	33.19 ± 0.45	No data

CH – конвекційне нагрівання ; MW – мікрохвильове нагрівання

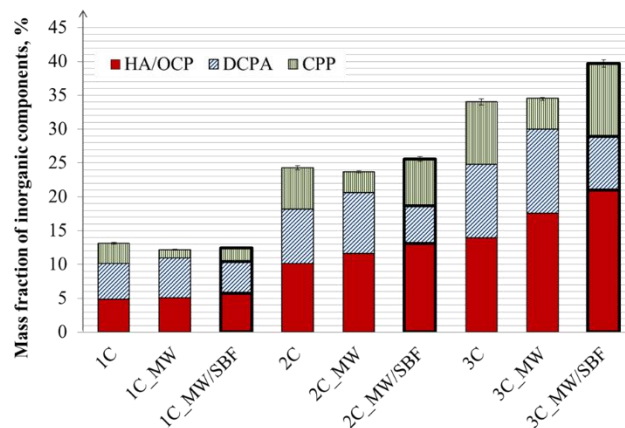


Рисунок 1.3 – Порівняльна характеристика масової частки ОФК у ГК, отримана при конвекційному нагріванні, та під впливом МХО після перебування у SBF протягом 28 днів

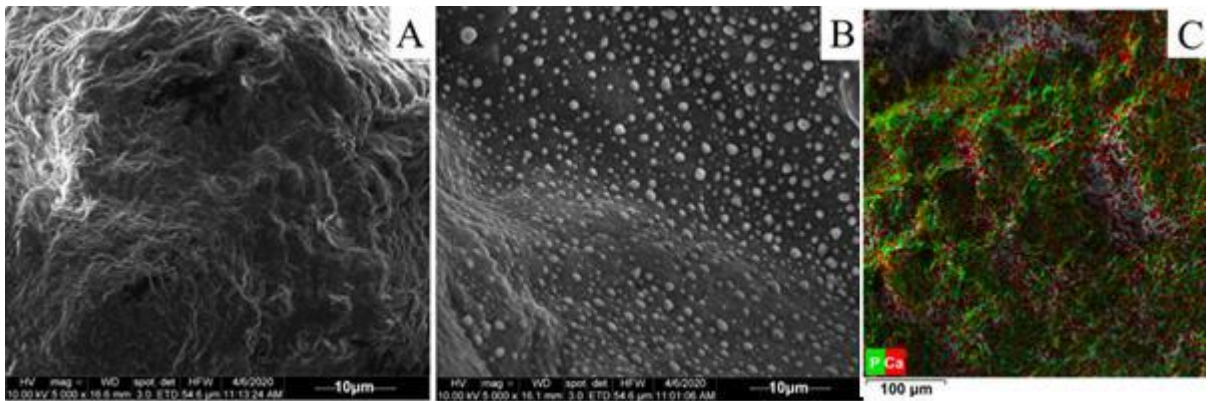


Рисунок 1.4 – SEM -зображення 3C_MW:

А - до, а В - через 28 днів перебування у SBF; С - EDX - карта розподілу кальцію та фосфору в матриці CS

Міцність на стиск. На рис. 1.5 показані механічні властивості зразків із співвідношенням $Ca/Cs = 0,75$, синтезованих під впливом МХО та конвекційного нагрівання під час стискання. Інші зразки під час завантаження були утилізовані на крихкість. Зразок з $Ca/Cs = 0,75$ був сплющений при стисканні навантаженням 85 МПа. Фрагментації зразка не спостерігалось, виникають відносно великі пластичні деформації ($dest \sim 0,24$), що може призвести до пластичного руйнування. Зразок з $Ca/Cs = 0,75$ під впливом МХО демонстрував значно меншу міцність на стиск (~ 40 МПа) порівняно з зразком $Ca/Cs = 0,75$ без МХО і розсипався при навантаженні 40 МПа.

Модуль Юнга визначається як відношення величини навантаження до величини пружної деформації зразка $E = \sigma_c / \varepsilon_{elast}$. Відносна деформація зразка при стисненні визначається як $\varepsilon = \Delta l / l_0$, де l_0 - початковий лінійний розмір зразка в напрямку дії сили, Δl - зміна розміру зразка при дії навантаження. Для отримання модуля Юнга проводили 3 цикли «навантаження-розвантаження» до невеликих значень навантаження ($\sigma_c = 12$ МПа в нашому випадку), щоб мінімізувати пластичні (тобто незворотні) деформації зразка (ε_{plast}), які зазвичай відбуваються для композитів після першого циклу навантаження паралельно із пружними деформаціями, і $\varepsilon = \varepsilon_{elast} + \varepsilon_{plast}$. При третьому циклі навантаження до тих самих значень σ_c , пластичні деформації практично

відсутні (через певний час після зняття навантаження розмір зразка відновлюється до значень на початку 3 циклу), тобто можна вважати, що $\varepsilon \approx \varepsilon_{elast}$ і визначаємо модуль Юнга як $E \approx \sigma_c / \varepsilon$. Оцінка модуля Юнга (E) показала, що значення E для зразка з МХО дорівнює 780 МПа, що набагато вище порівняно з зразком Ca/Cs = 0,75 без МХО (517 МПа). Результати показують відсутність прямого зв'язку між модулем Юнга (що відповідає за пружні деформації зразка) і міцністю зразка: в композитних матеріалах окрім пружної деформації (яка може бути невеликою при невеликих значеннях модуля Юнга) може відбуватися і пластична деформація при стисненні і в'язко-пружне руйнування зразка при значно вищих навантаженнях незважаючи на невисокий модуль Юнга, що і спостерігалось для зразка 1(3C) – він розплющився (рис. 1.5, крива 1).

Спектри фотолюмінесценції (PL) та FTIR. На рис. 1.6 представлені PL спектри для чистого CS та експериментальних ГК з співвідношенням Ca/CS 0,15, 0,45 та 0,75, синтезовані за допомогою як конвекційного нагрівання, так і МХО. PL спектри CS та ГК з декількох ділянок, які відповідають електронним переходам між зв'язуючими та незв'язуючими електронними орбіталями [82].

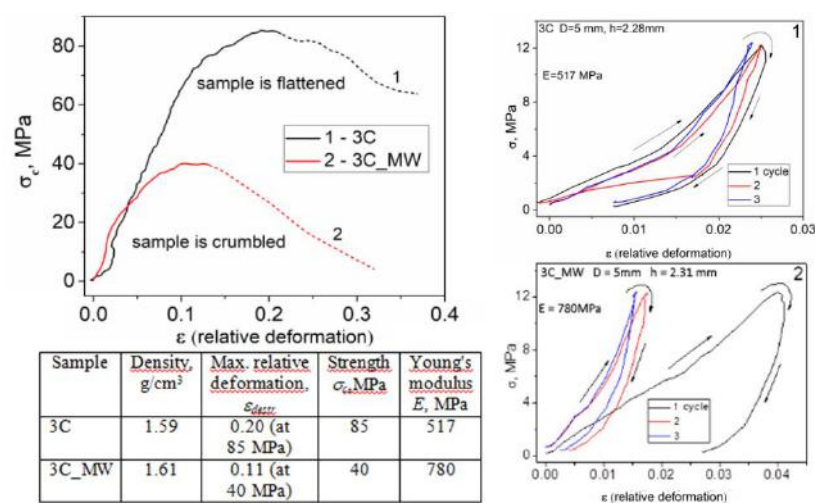


Рисунок 1.5 – Міцність σ_c зразків із співвідношенням Ca/Cs = 0,75. Діаграми "навантаження-розвантаження" зразків, виміряних при одноосному стисненні протягом трьох циклів навантаження

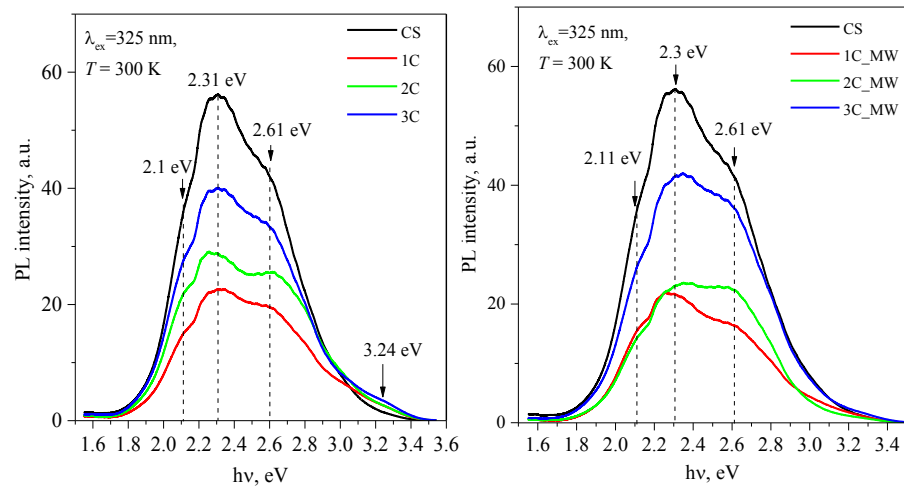


Рисунок 1.6 – Спектри PL порошоків НС та CS з різним співвідношенням Ca/CS, синтезовані за допомогою звичайного нагрівання (А) та МХО (В).

Смуга PL при 2,3 еВ відповідає переходу $\pi^* \rightarrow n$, смуга при 2,61 еВ - перехід $\pi^* \rightarrow \pi$, смуга при 3,0 еВ - перехід $\sigma^* \rightarrow n$, і при 3,24 еВ - $\sigma^* \rightarrow \sigma$. Інтегральна інтенсивність PL є найбільшою в спектрах чистого CS, як з МХО, так і без МХО. Для смуг при 2.1, 2.31, 2.61 еВ зміни інтенсивності PL обумовлені різним вмістом ОКФ. Зразки з Ca/CS = 0,15 демонструють значне зменшення інтегральної інтенсивності PL, що відповідає зменшенню молекулярної маси біополімеру [82]. Це можна пояснити тим, що як конвекційний нагрів, так і МХО спричиняють значне збільшення величини молекулярної вібрації, що збільшує контакт та тертя між CS та ОКФ. Це дозволяє легко розривати глікозидні зв'язки CS, зменшуючи молекулярну масу CS. Збільшення співвідношення Ca/CS збільшує частку утвореного ОКФ, що, у свою чергу, зменшує гнучкість ланцюга CS, запобігаючи фрагментації макромолекул, що проявляється в монотонному збільшенні інтенсивності PL (спектри зразків 2C, 3C, 2C_MW та 3C_MW).

На рис. 1.7 показані ІЧ -спектри поглинання чистого CS та ГК з різними співвідношеннями Ca/CS, синтезованих із застосуванням звичайного нагрівання.

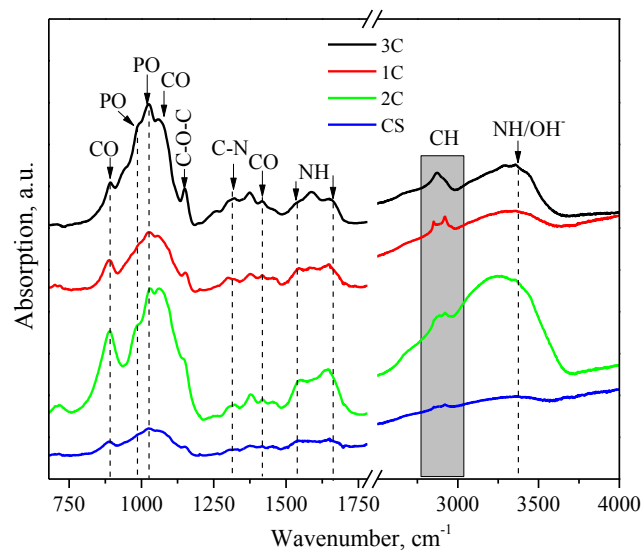


Рисунок 1.7 – FTIR-спектри поглинання зразками CS та ГК з різним співвідношенням Ca/CS, синтезованими за впливу конвекційного нагрівання.

Широкі смуги розтягування OH і N-H з центром 3430 cm^{-1} асоціюються з чистим CS. Вони також пов'язані з водневим зв'язком у CS [83]. Характеристика вібраційної смуги CS при 1655 cm^{-1} , асоційована з N-H (амідом) [84], зміщена до 1644 cm^{-1} у ГК. Пік деформації N-H, який зазвичай з'являється при 1577 cm^{-1} [85], зміщується до 1583 cm^{-1} . Смуга приблизно на 1324 cm^{-1} , що відповідає вигину C-N у CS, зміщується до 1307 cm^{-1} у ГК. Більш того, для МХО індукованих зразків (спектри не показані через незначні відмінності з наведеними вище), смуга зміщується до 1288 cm^{-1} . Ці факти свідчать про взаємодію між аміногрупами CS та функціональними групами ОФК. Смуги при $980, 1025, 1059\text{ cm}^{-1}$ відповідають коливанням РО-групи HPO_4^{2-} у ОСР, а також смугі при 1025 cm^{-1} у кдНА та карбонатнозаміщеному НА [78]. Смуги з частотами $877, 1422$ та 1456 cm^{-1} належать до груп CO_3^{2-} у ОСР та кдНА та вказують на утворення карбонатнозаміщених сполук типу В. У зразках, синтезованих під впливом МХО, смуга 1422 cm^{-1} є більш інтенсивною. Зміщення смуги розтягування CH_2 в області $2935\text{--}2870\text{ cm}^{-1}$ можуть свідчити про взаємодію між ОКФ та Cs через водневі $\text{OH}\cdots\text{O}$ зв'язки. Таким чином, виявлені коливання, характерні для НА та ОСР, підтверджують наявність обох фаз у отриманому в певних умовах ГК.

Абсорбційна здатність. Одним із показників біоактивності ГК є її здатність адсорбувати білки. Кістка складається з неорганічної частини (30%) та органічного матриксу (60%), 90%з яких базується на колагенових та неколагенових білках [86]. Серед неколагенових білків є фібронектин, до складу якого входить амінокислота Трп, яка була обрана в якості тестової моделі в нашому експерименті щодо адсорбційної здатності синтезованого ГК (рис.1.8).

Для того, щоб отримати адсорбційну ємність (q_e), кількість іонів, адсорбованих на одиницю маси, розраховували за такою формулою

$$q_e = (C_i - C_e)V/M,$$

де C_i і C_e - початкова та експериментальна концентрації (ммоль/л),
 M і V - маса адсорбенту (204,2 г/моль) та об'єм розчину.

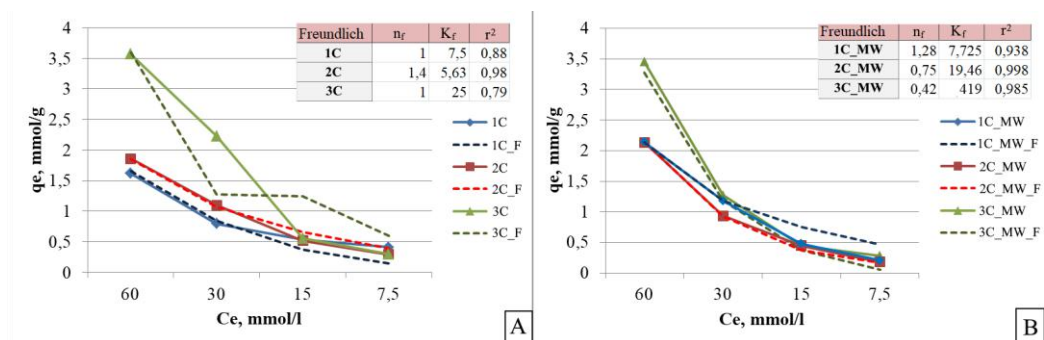


Рисунок 1.8 – Кінетичні моделі адсорбції Трп експериментальними зразками: А - 1С; 2С, 3С; В - 1С_МВ; 2С_МВ; 3С_МВ. Суцільною лінією показані експериментальні дані адсорбції Трп, пунктирною - розрахункові дані відповідності ізотермі Фгейндліха (FІ)

Дані адсорбції Трп були протестовані щодо їх відповідності рівнянню ізотерми Фрейндліха. Середнє відсоткове відхилення між експериментальними та прогнозованими результатами визначалося шляхом

мінімізації цільової функції. Дійсність моделі перевіряється відповідними коефіцієнтами кореляції (r^2). Ізотерма Фрейндліха визначає неоднорідність поверхні та експоненційний розподіл енергії активних центрів.

$$q_e = K_f C_e^{1/n},$$

де K_f - відносний показник адсорбційної ємності; безрозмірний $1/n$ вказує на енергію або інтенсивність реакції і свідчить про перевагу та ємність системи адсорбенту/адсорбату.

Коли $1/n$ більше нуля ($0 < 1/n < 1$), адсорбція сприятлива, коли $1/n$ більше 1, процес адсорбції несприятливий, коли $1/n = 1$ процес адсорбції є незворотнім. Виходячи з розрахованих значень коефіцієнта кореляції r^2 , можна сказати про найкращу кореляцію даних з умовами FI. Модель FI описує оборотний та неідеальний процес адсорбції, де можлива багатошарова адсорбція [87], а також експоненційний розподіл активних центрів та їх енергій. Параметр $1/n_f$ вказує на енергію або інтенсивність реакції та сприятливу ємність системи адсорбент/адсорбат. Коли n_f дорівнює 1, FI перетворюється в рівняння Генрі, яке описує однорідну адсорбцію. Очевидно, що адсорбція T_{gr} більше контролюється неорганічною частиною гібридного матеріалу. Таким чином, зразки 3C та 3C_MW демонструють найбільшу здатність адсорбувати T_{gr} з його більш концентрованих розчинів (60-30 ммоль/л) через збільшення частки НА/ОСР. Дещо підвищена адсорбція на 1C_MW та 2C_MW порівняно з зразками 1C та 2C спостерігається через більш інтенсивне перетворення під впливом МХО утвореного АСР на НА та ОСР. Як згадувалося вище, ОСР характеризується підвищеною здатністю порівняно з іншими ОФК адсорбувати органічні молекули через існування гідратного апатитного шару.

Висновок: Таким чином, зформований *in situ* гібридний матеріал представлений матрицею CS з включеними та однорідно розподіленими

поліфазними ортофосфатами кальцію які є прекурсорами cdHA . Досліджено співвідношення Ca/CS та вплив МХО на формування полі фазного ОФК. ІЧ-дослідження показали наявність CO_3^{2-} -груп в ОСР та cdHA , підтвердивши утворення карбонат-апатитної сполуки з заміщенням типу В. Під впливом МХО відбувається більш інтенсивне включення карбонатних іонів. Використовуючи МХО та збільшуючи співвідношення Ca/CS , середній вміст HA/OSR у зразках 1C_MW, 2C_MW, 3C_MW зростає на 5, 7, 10 мас %, а частка СРР зменшується відповідно на 13, 12 та 24%. В той же час вміст DCPA у МХО індукованих зразках збільшується порівняно з синтезованими за впливу конвекційного нагріву. Зменшення СРР означає, що мікрохвильове випромінювання сприяє утворенню більш стабільних ОФК (HA , OSR , DCPD), ніж АСР. Після витримання у SBF протягом 28 днів на поверхні композитів утворюється новий шар АСР, який є попередником DCPD , OSR та cdHA . У SBF спостерігається спорідненість поверхні до іонів кальцію, тому співвідношення Ca/P збільшується в десятки разів. Цей факт підтверджує високу біоактивність поліфазного гібридного композиту. Матеріали характеризуються відносно низьким набряканням порівняно до інших композитів з вмістом органічної складової. Ступінь набрякання що зменшується зі збільшенням співвідношення Ca/CS та за впливу МХО. Композит з $\text{Ca/CS} = 0,75$, синтезований під дією МХО, демонстрував значно меншу міцність на стиск (~ 40 МПа) і набагато вищий модуль Юнга (780 МПа) у порівнянні з синтезованим за конвекційного нагрівання (85 та 517 МПа), відповідно. У зразках із співвідношенням $\text{Ca/CS} = 0,15$ спостерігається значне зменшення інтегральної інтенсивності PL , що означає зменшення молекулярної маси CS , викликане розривом глікозидних зв'язків та фрагментацією внаслідок молекулярних коливань. Адсорбція Trp в основному контролюється неорганічною частиною гібридного матеріалу. Отже, найбільш значну здатність адсорбувати Trp демонструють зразки з співвідношенням $\text{Ca/CS} = 0,75$ через найвищий вміст HA/OSR . Адсорбція Trp добре поєднується

з моделлю ізотерми Фрейндліха, яка описує оборотний та не ідеальний процес, в якому можлива багат шарова адсорбція.

2. ВИВЧЕННЯ ОСНОВ ФОРМУВАННЯ СТРУКТУРНОЇ МОДЕЛІ НАНОКОМПОЗИТНИХ НЕРВОВИХ ПРОВІДНИКІВ З ВМІСТОМ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОЧАСТИНОК

2.1 Огляд світової наукової літератури щодо методик синтезу наноструктурованого матеріалу для нервових провідників

На зміну комерційним силіконовим нервовим провідникам (кондуїтам), які мали низьку здатність до деградації, прийшли альтернативні матеріали. Серед них як природні полімери (хітозан, альгінат, колаген, желатин і гіалуронова кислота), так і синтетичні полімери (полілактид (PLA), полігліколід (PGA), полі (молочна ко-гліколева кислота) (PLGA), полікапролактон (PCL). Полімери природного походження є більш сумісними для клітин, менш токсичні, а також можуть позитивно впливати на клітинну проліферацію та міграцію. Нервові провідники мають відповідати ряду вимог, а саме не проявляти токсичності, мати хорошу механічну міцність і еластичність, меншу імуногенну реакцію, бути біорозкладними, забезпечувати швидку регенерацію нерва. Тому природні полімери займають лідируючу позицію серед кандидатів на регенерацію периферичних нервів [88,89]. Серед природних полімерів в інженерії нервової тканини часто застосовують альгінат та хітозан. Альгінат – це структурний полімер бурих морських водоростей, який містить моносахариди d-маннуринової кислоти та α -l-глюкуронової кислоти, які пов'язані β -(1–4) глікозидними зв'язками [90]. Основною перевагою цього матеріалу є структурна близькість до сполучної тканини. Це дає можливість забезпечити відповідне мікросередовище для стимуляції регенерації дефектних дистальних і проксимальних сегментів. Крім того, швидкість деградації альгінату може забезпечити проростання аксонів [91]. Пориста структура альгінатної губки стимулює вивільнення сигнальних молекул з дегенерованого нерва і таким чином can also support the axonal guidance [92]. Хітозан є природним катіонітом та структурним елементом хітину, присутнього в цитоскелетоні ракоподібних. Він складається з

повторюваних глюкозамінових і N-ацетилглюкозамінових груп, які пов'язані глікозидним зв'язком [93]. Унікальні властивості хітозану приваблюють багатьох дослідників у галузі периферичної тканинної інженерії [94]. Поєднання хітозану з іншими полімерами може покращити механічні та біологічні властивості.

Недавні дослідження показали, що в процесі регенерації нервових тканин важливу роль відіграє електрична стимуляція (electrical stimulation) [95]. Пряма інтраопераційна електрична стимуляція пошкодженої нервової тканини посилює та прискорює її функціональне відновлення [96]. Існує широкий спектр застосувань електростимуляції, яка розглядається як важлива схема функціоналізації процесу регенерації нервової тканини. При цьому вважається, що оптимальним засобом для регенерації нервів мають пасивні електростимулятори. Цієї мети можна досягнути як застосуванням електричного поля, так і внесенням провідних матеріалів до складу кондуїтів. Серед провідних матеріалів особливу увагу викликають матеріали на основі вуглецю, а саме графен та його оксид, карбонові нанотрубки. Ці матеріали оснащені провідними функціями і сприяють взаємодії клітин та матеріалу завдяки високому відношенню площі поверхні до об'єму [91]. Показано, що нервові провідники, виготовлені з вмістом оксиду графену з метою досягнення електричної стимуляції, можуть впливати на адгезію клітин та їх рухливість під електричним полем. Однак швидкість деградації таких кондуїтів залишається несприятливою. Також все ще не з'ясований механізм, який лежить в основі функції електричної стимуляції [89]. Повідомляється про тришаровий кондуїт, середній шар якого містить магнітні наночастинки (Fe_3O_4 -MNPs) [97]. На основі електрофізіологічного тесту щодо оцінки електроактивності регенованого нерва було показано, що помітне електрофізіологічне відновлення регенованих сідничних нервів є результатом послідовного релізу Мелатоніну та магнітних наночастинок (Fe_3O_4 -MNPs). Як повідомляється, Fe_3O_4 -MNPs можуть індукувати розширення аксона під зовнішнім магнітним полем без побічних ефектів [98].

Наночастинки ZnO, MgO, а також Fe₃O₄ сприяють відновленню пошкодженої нервової тканини через їх функціоналізовану поверхню, електричні, магнітні та біоактивні властивості. Присутність Mg забезпечувала електропровідний шлях для передачі нервових імпульсів і таким чином стимулювала м'яз [99]. Таким чином, ці частинки можуть бути використані в композитах за умови їх рівномірного розподілу у матеріалі, а також після ретельного визначення оптимального дозування та концентрації, які необхідні для покращення ефекту відновлення.

2.2 Перспективи застосування вуглецевих наночастинок при створенні біоматеріалів

Літературні дані свідчать про великі перспективи застосування вуглецевих наночастинок (ВНЧ) при створенні біоматеріалів. Стимулом для використання в матеріалознавстві відкритих в 1991 році вуглецевих нанотрубок (ВНТ) [100] є набір їх чудових механічних і унікальних електричних властивостей, висока термічна та хімічна стабільність [101]. ВНТ є одними з найміцніших матеріалів у світі. Їх міцність на розрив у сто разів перевищує міцність сталі, а щільність майже в сім разів менша за щільність сталі [102]. ВНТ мають від однієї до десятків графітових оболонок, безшовно загорнутих у циліндричну трубку [103]. Серед вуглецевих наночастинок фулерен є найбільш симетричною і стабільною молекулою (М.М.760 а.м.у., $\Delta H = -8,06$ Ккал/атом) у світі з неймовірними властивостями. Він має унікальну структуру, що складається з sp^2 атомів вуглецю, які утворюють високу симетричну клітку з різними розмірами (C₆₀, C₇₀ і так далі). Найпоширенішим серед них є C₆₀, який містить 60 атомів вуглецю. Має внутрішню порожнину діаметром 0,5 нм, є акцептором електронів, при дії сильних відновників може приймати до 6 електронів. Унікальні фізико-хімічні властивості фулерену роблять його перспективним матеріалом для медицини. Але біологічному застосуванню цих молекул часто перешкоджає їх нерозчинність у воді та низька розчинність у багатьох органічних розчинниках. Для таких цілей часто

потрібна функціоналізація, яка може змінити загальні властивості первісного фулерену [104]. Істинний фулерен не містить атомів водню і не може брати участь у реакціях заміщення. Проте фулерени є окислювачамм і можуть утворювати активні форми кисню, зокрема під впливом УФ-видимого опромінення [105]. У серії досліджень ряд авторів показали, що C_{60} і його водна дисперсія можуть надавати антиоксидантні властивості в організмі, головним чином шляхом нейтралізації та / або приєднання АТФ і вільних радикалів [106]. Було показано, що фулерен C_{60} інгібував вільнорадикальні та деструктивні процеси в сполучній тканині при ад'ювантному артриті у щурів [107]. Дослідження довели, що водні суспензії фулеренів виявляють відносно сильну антибактеріальну активність, яка залежить від розміру частинок: більш дрібні агрегати мали вищу антибактеріальну активність [108,109]. Похідні фулерену активно досліджуються в контексті фотокаталітичних застосувань, у мембранній технології для очищення природної води [110]. В останнє десятиліття велика увага приділяється системам доставки та вивільнення ліків на основі наночастинок різного походження [111]. Серед них виділяють вуглецеві наночастинок завдяки своїй здатності перетинати клітинні мембрани [112]. Властивості поверхні, гідрофільність, розмір і форми дозволяють використовувати вуглецеві наночастинок як транспортний засіб для доставки ліків у клітини [113].

Утворення гібридних композитів з вмістом ВНТ можуть логічно призвести до розширення спектру їх властивостей, в тому числі і біологічну активність, яка є ключем до біомедичних застосувань. Перспектива застосування ВНЧ- альгінатних скафолдів у тканинній інженерії була продемонстрована в одному з перших досліджень таких композитів [114], що було підтверджено в подальших роботах [115]. ВНЧ мають малі габарити, високу міцність і жорсткість, високе співвідношення довжини до діаметра, що дає їм чудовий потенціал для використання. Багатостінні вуглецеві нанотрубки (MWCNT) складаються з багатьох шарів графену, розташованих концентрично. Вони мають діаметр від 2 до 100 нм і довжину від кількох

мікрометрів до кількох міліметрів. Хімія MWCNT поверхні дозволяє функціоналізувати їх для конкретних застосувань. MWCNT використовуються в біосенсорах для визначення ліків і іонів металів та наразі вважаються найбільш привабливими функціональними допоміжними речовинами для наномедицини [116]. MWCNT здатні проникати через клітинну плазматичну мембрану [117], взаємодіяти з ДНК [118], можуть бути націленими на пухлину. MWCNT мають центральне порожнисте ядро, яке може бути завантажене терапевтичним препаратом [119]. Присутність ВНЧ в біокомпозитах не має шкідливих побічних ефектів і може навіть посилити його біоактивність [120].

2.3. Розробка методу формування наноструктурованого матеріалу для нервових провідників на основі біополімерів (хітозан, альгінат) з вмістом вуглецевих наночастинок (фулерен C₆₀, одностінні вуглецеві нанотрубки, SWNTs)

Наступні матеріали будуть використані: фулерен C₆₀ (водний колоїдний розчин із середнім розміром частинок 50 нм), виготовлений згідно з [121]; SWNTs, виготовлені згідно з [122]; CS (M.m. 300 кДа, Acros organics, США), альгінат натрію (низька в'язкість, E407) був придбаний у Sanpu Chemical CO., Ltd, Шанхай, Китай. Усі реагенти мають бути аналітичного ступеню чистоти і будуть використані в тому вигляді, в якому отримані.

Оскільки дана розробка ще не була опублікованою з причини військових дій та пов'язаної з цим затримки в проведенні досліджень, наразі приводяться теоретичні аспекти виготовлення кондуїтів.

Матеріал для виготовлення нервових провідників буде представлений полімерною матрицею з природних полімерів (альгінат, хітозан, желатина). Вказана матриця механічно стабілізована шляхом поліелектролітної взаємодії альгінату з молекулами хітозану. В своїй структурі CS має три типи реактивних функціональних груп, які забезпечують його хімічні взаємодії, а саме: аміногрупи в позиції C-2, а також первинні та вторинні гідроксильні групи в C-6 та C-3 позиціях відповідно. Глюкозамінні ланки в структурі

хітозану є місцями приєднання до його молекулярного ланцюга. Так, в протонаній формі аміногрупи дозволяють приєднання через електростатичну взаємодію, нуклеофільні властивості амінів дозволяють приєднання шляхом ковалентних зв'язків, оскільки аміни мають активну іонну пару електронів на електронегативному атомі азоту.

З іншого боку є дані про низьку адгезивність клітин до альгінату через погану адсорбцію білка, викликану його гідрофільною природою [123]. Тому запропоноване комплексне застосування альгінату з хітозаном для посилення взаємодії клітин, адгезії та проліферації. В якості пластифікатора буде застосований поліетиленгліколь та/або генепін. Планується, що кондуїт буде багатошаровим. Частина з шарів буде активована вуглецевими наночастинками або іншими частинками неорганічного походження. На зовнішній шар кондуїту може бути нанесене полімерне покриття.

3. ТЕОРЕТИЧНА РОЗРОБКА МОДЕЛІ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ ОСНАСТКИ ДЛЯ ФОРМУВАННЯ КОНДУЇТІВ ТРУБЧАТОЇ ФОРМИ. ПОПЕРЕДНІ ФІЗИКО-БІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСУМІСНОСТІ МАТЕРІАЛІВ *IN VITRO*

3.1 Теоретична схема пристрою для синтезу нервових провідників

Теоретична схема лабораторної технологічної оснастки для формування кондуїтів трубчастої форми знаходиться у стані розробки та подальшого удосконалення. Оскільки в період військових дій не було можливості провести експериментальні роботи щодо використання розробленої моделі для синтезу, на рис. 3.1 приводиться орієнтовна схема такого пристрою.

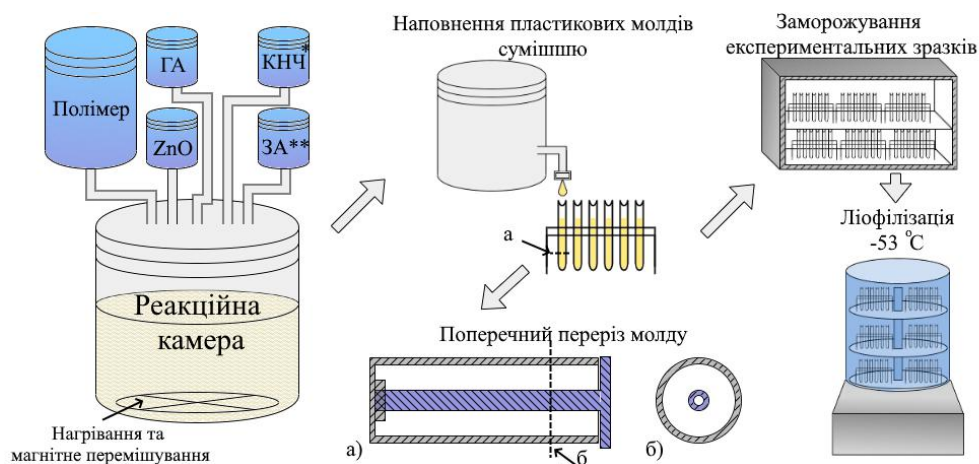


Рисунок 3.1 – Теоретична схема лабораторної технологічної оснастки для формування кондуїтів

На рис. 3.2 наведено зображення поперечного розрізу композитів з вмістом C60 та SWCNTs на різних етапах синтезу. Композити отримані з застосуванням вище приведеного пристрою, а структура синтезованих кондуїтів досліджена за допомогою цифрового мікроскопа серії VHX-7000 та оптичного мікроскопа.

На рис. 3.2b ми спостерігаємо агломеровані наночастинки фулерену, що свідчить про недостатню гомогенізацію колоїдної суспензії. Слід також зазначити, що процес «зшивання» значно зменшує пористість матеріалу та товщину його стінок. Товщина стінки ліофілізованого кондуїту становить 1,2-2 мм, а після зшивання – 0,2-0,5 мм.

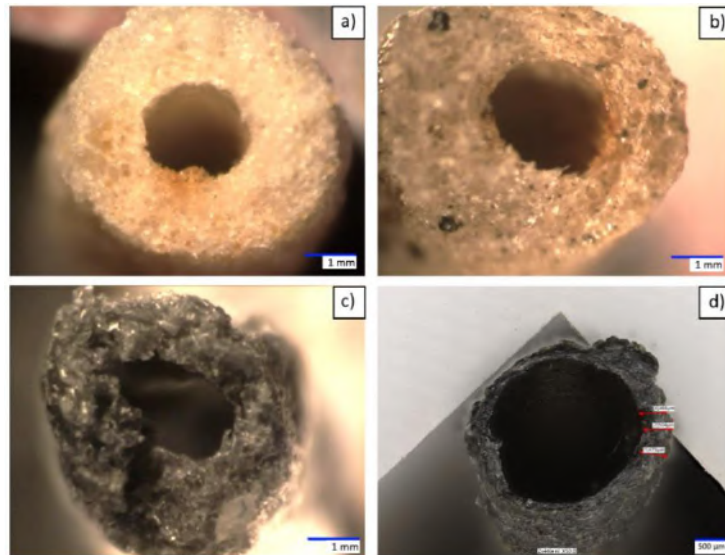


Рисунок 3.2 – ЕМ-результати синтезованих зразків до «зшивання» а) Alg_control, б) Alg_0.005 Full; Alg_0.005 SWCNT до с) і після d) «зшивання»

3.2. Результати фізико-біологічних досліджень біосумісності матеріалів *in vitro*

3.2.1 Вплив карбонових наночастинок на властивості композитного матеріалу для нервових провідників

Ступінь набрякання (S_w) визначали кількісно шляхом вимірювання змін маси зразка як функції часу занурення у фосфатно-сольовий буфер (PBS). Висушені зразки масою 0,1 г занурювали в PBS на 24-48 год. Потім зразки обережно виймали з розчину і поміщали на фільтрувальний папір на 5 хвилин, після чого зважували (Han et al. 2013).

Електропровідні характеристики. Опір ізоляції постійному струму вимірювали мегомметром типу М 4100/4 та приладом М 9508 MASTECH.

Сила струму, який проходив через зразки, вимірювалась приладом MASTECH MS 8040. Ємність та індуктивність приладом MASTECH MS 5308. Для визначення сили струму, який пропускали через зразок, застосовували генератор сигналів спеціальної форми Г6-34. Величина амплітуди сигналу змінної напруги складала 60 мВ, частота напруги 50-1500 Гц.

Кожен тест в експерименті повторювався тричі. Статистичне порівняння проводили за допомогою непарного t-критерію та одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним тестом Даннетта для численних порівнянь. Статистично значущою різниця між дослідом і контролем вважається достовірною при $p \leq 0,05$.

Результати дослідження зразків щодо ступеню їх набрякання приведені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Залежність ступеню набрякання (S_w) зразків у розчині SBF від концентрації карбонових наночастинок та наявності поверхневого шару PLA

	S_w , %			S_w після PLA покриття, %		
	0.5 h	24 h	48 h	0.5 h	24 h	48 h
Alg_control	621 ± 10	810 ± 15	941 ± 20	295 ± 8	514 ± 10	731 ± 14
Alg_0.005 Full	275 ± 5	535 ± 11	626 ± 17	205 ± 4	319 ± 8	444 ± 11
Alg_0.01 Full	212 ± 5	411 ± 12	508 ± 13	121 ± 3	140 ± 3	201 ± 4
Alg_0.005	281 ± 7	553 ± 12	670 ± 14	156 ± 4	178 ± 4	385 ± 6
SWCNTs						
Alg_0.01	253 ± 7	480 ± 10	580 ± 13	153 ± 4	201 ± 5	312 ± 7
SWCNTs						

Результати свідчать, що вміст карбонових наночастинок зменшує ступінь набрякання композитів у порівнянні до контрольного зразку. Підвищення концентрації наночастинок у 2 рази призводить до зменшення S_w в середньому на 15- 20% через 48годин. Зразки з вмістом SWCNTs демонструють дещо вищий ступінь набрякання. Очевидно, що вказані зразки

мають більшу питому поверхню за рахунок трубчатого структури SWCNTs, що сприяє підвищенню ступеню адсорбції рідини. Після нанесення гідрофобного шару PLA на зовнішню поверхню композитів зменшує ступінь набрякання.

Електропровідні характеристики. Вище було зазначено важливість електростимуляції в процесах регенерації ушкоджених нервів. Серед ряду методів електростимуляції оптимальними вважаються пасивні електростимулятори, які базуються на внесенні провідних матеріалів до складу кондуїтів. В даній роботі був досліджений вплив карбонових наночастинок на електропровідні характеристики композитних матеріалів для кондуїтів. Експериментальні дані щодо електропровідності, отримані в цій роботі, відповідають характеристикам полімерних гідрогелів, які є кандидатами на використання в інженерії нервової тканини (таблиця 3.2).

Таблиця 3.2 – Електропровідні характеристики експериментальних зразків

	Електропровідність, S/ cm	Сила струму, μA	Ємність, pF
Alg_control	1.25×10^{-3}	0.01	4.3
Alg_0.005 Full	1.54×10^{-3}	0.02	4.5
Alg_0.005 SWCNTs	3.49×10^{-3}	0.04	4.3
Electroactive colloidal hydrogels for neural tissue engineering (literature data)	3×10^{-4} [124] 6×10^{-2} [125] $2.41 \times 10^{-5} - 8 \times 10^{-3}$ [126] $1.5 \times 10^{-3} - 5.7 \times 10^{-3}$ [127]		

Електропровідність розраховували за наступною формулою:

$$\sigma = L/RS,$$

де R , L і S представляють вимірний опір (R), довжину між двома електродами (L) і ефективну площу поперечного перерізу (S) зразка, відповідно [128].

Результати (таблиця 3.2) показують, що введення вуглецевих наночастинок зменшує опір матеріалу порівняно з контрольним зразком (Alg_control), полегшуючи проходження електричного струму. Зразок, що містить SWCNTs, має вдвічі кращі електропровідні характеристики порівняно з фулереном C60.

Висновок. Розробка та виробництво складних біоматеріалів, які можуть сприяти процесу загоєння пошкоджених нервів, є метою дослідників у галузі регенеративної медицини. У поточному дослідженні ми мали на меті розробити технологію створення пористих та двошарових кондуїтів на основі альгінату з вуглецевими наночастинами, такими як фулерен C60 та SWCNT, і ті самі кондуїти, покриті гідрофобним шаром PLA. Характеристики показали, що отримані матеріали мають відповідні властивості, корисні для інженерії нервової тканини. Вуглецеві наночастинки, а також створений шар PLA значно знижують ступінь набрякання синтезованих матеріалів. Зразок, що містить SWCNTs, має вдвічі кращі електропровідні характеристики порівняно з фулереном C60. Експериментальні дані щодо електропровідності, отримані в цій роботі, відповідають відповідним характеристикам полімерних гідрогелів, які є кандидатами на використання в інженерії нервової тканини. Ці результати показали, що отримані пористі композити можуть бути використані як біоактивний матеріал для регенерації пошкоджених периферичних нервів після біологічних досліджень.

ВИСНОВКИ

1. На основі вивчення світового наукового доробку проведено теоретичне планування синтезу базової моделі наноструктурованих нервових провідників на основі біополімерів, модифікованих наночастинками неорганічного походження.

2. Розроблені теоретичні основи формування наноструктурованих біоматеріалів з застосуванням тільки природних полімерів з метою забезпечення біорозкладного та не токсичного характеру нервових провідників

3. Проведена теоретична розробка методики синтезу біоматеріалу для периферичних нервових провідників на основі природних полісахаридів (хітозан, альгінат) з вмістом вуглецевих наночастинок (фулерен C₆₀, одностінні вуглецеві нанотрубки SWCNT).

4. Запропоновано застосування гібридного органічно-неорганічного композиту на основі тривимірної сітки біомакромолекул з включеними частинками ОФК в якості матеріалу для кондуїтів.

5. Електропровідні властивості біоматеріалу забезпечені шляхом внесення до структури вуглецевих наночастинок.

6. Створений *in situ* гібридний матеріал представлений матрицею CS з включеними та однорідно розподіленими поліфазними ортофосфатами кальцію (ОФК). Досліджено вплив співвідношення Ca/CS та мікрохвильового опромінення (МХО) на формування поліфазного ОФК. Доведено, що МХО сприяє утворенню більш стабільних ОФК (гідроксиапатиту (НА), октакальцій фосфату (ОСР), брушиту (DCPD)). У фізіологічному розчині SBF спостерігається спорідненість поверхні до іонів кальцію, збільшується співвідношення Ca/P, що підтверджує високу біоактивність поліфазного гібридного композиту. Ступінь набрякання зменшується зі збільшенням співвідношення Ca/CS та за впливу МХО. Під час синтезу композиту з Ca/CS = 0,75 під дією МХО модуль Юнга збільшується до 780 МПа проти 517 МПа

для зразка, синтезованого за конвекційного нагрівання. У зразках із співвідношенням $Ca/CS = 0,15$ спостерігається значне зменшення інтегральної інтенсивності, що означає зменшення молекулярної маси хітозану, викликане розривом глікозидних зв'язків та фрагментацією внаслідок молекулярних коливань. Адсорбція амінокислоти триптофану (Trp) в основному контролюється неорганічною частиною гібридного матеріалу. Отже, найбільш значну здатність адсорбувати Trp демонструють зразки з співвідношенням $Ca/CS = 0,75$ через найвищий вміст HA/OCP. Адсорбція Trp добре поєднується з моделлю ізотерми Фрейндліха, яка описує оборотний та не ідеальний процес, в якому можлива багатошарова адсорбція.

7. Розроблені теоретичні основи формування мультишарових нервових провідників з вмістом вуглецевих наночастинок (фулерен C₆₀) та полімерним PLA покриттям зовнішнього шару. Попередні дослідження довели, що вуглецеві наночастинок, а також шар PLA знижують ступінь набрякання (SW) синтезованих матеріалів. Підвищення концентрації наночастинок у 2 рази призводить до зменшення SW в середньому на 15- 20%.

8. Доведено, що зразок з вмістом SWCNT має вдвічі кращі електропровідні характеристики порівняно з фулереном C₆₀. Отримані попередні експериментальні дані щодо електропровідності відповідають характеристикам полімерних гідрогелів (за даними світових наукових джерел), які є кандидатами на використання в інженерії нервової тканини.

9. Здійснена теоретична розробка моделі технологічної оснастки для формування кондуїтів.

10. Створені три попередні лабораторні методики одержання біорозкладних біополімер-вуглецевих 3D наноструктур у формі трубчастих або пластинчастих систем. Методики потребують подальшого вдосконалення та перевірки шляхом експериментального застосування та дослідження результатів.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Sukhodub L.F. et al. Antibacterial and physical characteristics of silver-loaded hydroxyapatite/alginate composites // *Funct. Compos. Struct.* 2021. Vol. 3, № 4. P. 045010.
2. Sukhodub L.B. et al. Composite material based on hydroxyapatite and multi-walled carbon nanotubes filled by iron: Preparation, properties and drug release ability // *Mater. Sci. Eng. C.* 2018. Vol. 93.
3. Kokubo T., Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27, № 15.
4. Vovchenko L. et al. Mechanical and electrical properties of the epoxy composites with graphite nanoplatelets and carbon nanotubes // *Phys. status solidi.* 2014. Vol. 211, № 2.
5. Heinzl J.C. et al. Nerve reconstruction with muscle-in-vein conduits VS autologous nerve grafts - a systematic review and meta-analysis of preclinical and clinical studies // *Peripher. nerve Regen.* 2021.
6. Carvalho C.R. et al. Investigation of cell adhesion in chitosan membranes for peripheral nerve regeneration // *Mater. Sci. Eng. C.* 2017. Vol. 71.
7. Lu P. et al. The balanced microenvironment regulated by the degradants of appropriate PLGA scaffolds and chitosan conduit promotes peripheral nerve regeneration // *Mater. Today Bio.* 2021. Vol. 12. P. 100158.
8. Qian Y. et al. Functional nanomaterials in peripheral nerve regeneration: Scaffold design, chemical principles and microenvironmental remodeling // *Mater. Today.* 2021. Vol. 51. P. 165–187.
9. Manoukian O.S. et al. Functional polymeric nerve guidance conduits and drug delivery strategies for peripheral nerve repair and regeneration // *J. Control. Release.* 2020. Vol. 317. P. 78–95.
10. Petriv T.I. et al. STEM CELL TECHNOLOGY IN PERIPHERAL NERVE RESTORATION // *East. Ukr. Med. J.* 2020. Vol. 8, № 2. P. 210–229.

11. Parker B.J. et al. Nerve guidance conduit development for primary treatment of peripheral nerve transection injuries: A commercial perspective // *Acta Biomater.* 2021. Vol. 135. P. 64–86.
12. Butler D.P. et al. Objective sensory and functional outcomes at the donor site following endoscopic-assisted sural nerve harvest // *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* 2017. Vol. 70, № 5. P. 659–665.
13. Moradzadeh A. et al. The impact of motor and sensory nerve architecture on nerve regeneration // *Exp. Neurol.* 2008. Vol. 212, № 2. P. 370–376.
14. Wolford L.M., Stevao E.L.L. Considerations in Nerve Repair // *Baylor Univ. Med. Cent. Proc.* 2003. Vol. 16, № 2. P. 152–156.
15. Mohammadi J. et al. Comparison of repair of peripheral nerve transection in predegenerated muscle with and without a vein graft // *BMC Neurol.* 2016. Vol. 16, № 1. P. 237.
16. Gontika I. et al. Decellularized Human Umbilical Artery Used as Nerve Conduit // *Bioengineering.* 2018. Vol. 5, № 4. P. 100.
17. Sulaiman O.A.R., Gordon T. Transforming growth factor- β and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo // *Glia.* 2002. Vol. 37, № 3. P. 206–218.
18. Belanger K. et al. Recent Strategies in Tissue Engineering for Guided Peripheral Nerve Regeneration // *Macromol. Biosci.* 2016. Vol. 16, № 4. P. 472–481.
19. Ray W.Z., Mackinnon S.E. Management of nerve gaps: Autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy // *Exp. Neurol.* 2010. Vol. 223, № 1. P. 77–85.
20. Ikegami Y., Ijima H. Development of heparin-conjugated nanofibers and a novel biological signal by immobilized growth factors for peripheral nerve regeneration // *J. Biosci. Bioeng.* 2020. Vol. 129, № 3. P. 354–362.
21. IJPMMA F.F.A., VAN DE GRAAF R.C., MEEK M.F. The Early History of Tubulation in Nerve Repair // *J. Hand Surg. (European Vol.* 2008. Vol. 33, № 5. P. 581–586.

22. Zhang P. et al. [Clinical effect observation of biodegradable conduit small gap tubulization repairing peripheral nerve injury]. // *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2012. Vol. 44, № 6. P. 842–846.
23. Sarker M. et al. Strategic Design and Fabrication of Nerve Guidance Conduits for Peripheral Nerve Regeneration // *Biotechnol. J.* 2018. Vol. 13, № 7. P. 1700635.
24. Catala M., Kubis N. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. 2013. P. 29–41.
25. Grinberg Y. et al. Fascicular Perineurium Thickness, Size, and Position Affect Model Predictions of Neural Excitation // *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* 2008. Vol. 16, № 6. P. 572–581.
26. Khan H., Perera N. Peripheral nerve injury: an update // *Orthop. Trauma*. 2020. Vol. 34, № 3. P. 168–173.
27. Kaplan B., Levenberg S. The Role of Biomaterials in Peripheral Nerve and Spinal Cord Injury: A Review // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 3. P. 1244.
28. Pfister B.J. et al. Biomedical Engineering Strategies for Peripheral Nerve Repair: Surgical Applications, State of the Art, and Future Challenges // *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 2011. Vol. 39, № 2. P. 81–124.
29. Clements M.P. et al. The Wound Microenvironment Reprograms Schwann Cells to Invasive Mesenchymal-like Cells to Drive Peripheral Nerve Regeneration // *Neuron*. 2017. Vol. 96, № 1. P. 98-114.e7.
30. Myers J.P., Santiago-Medina M., Gomez T.M. Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin-ecm interactions // *Dev. Neurobiol.* 2011. Vol. 71, № 11. P. 901–923.
31. Venstrom K.A., Reichardt L.F. Extracellular Matrix 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system // *FASEB J.* 1993. Vol. 7, № 11. P. 996–1003.
32. Yuan T. et al. Collagen hydrogel as an immunomodulatory scaffold in cartilage tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2014. Vol. 102, № 2. P. 337–344.

33. Masand S.N. et al. The effect of glycomimetic functionalized collagen on peripheral nerve repair. // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33, № 33. P. 8353–8362.
34. Stabenfeldt S.E., García A.J., LaPlaca M.C. Thermoreversible laminin-functionalized hydrogel for neural tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2006. Vol. 77A, № 4. P. 718–725.
35. Yang Y. et al. Small molecules combined with collagen hydrogel direct neurogenesis and migration of neural stem cells after spinal cord injury // *Biomaterials*. 2021. Vol. 269. P. 120479.
36. Führmann T., Anandakumaran P.N., Shoichet M.S. Combinatorial Therapies After Spinal Cord Injury: How Can Biomaterials Help? // *Adv. Healthc. Mater.* 2017. Vol. 6, № 10. P. 1601130.
37. Shahriari D. et al. Hierarchically Ordered Porous and High-Volume Polycaprolactone Microchannel Scaffolds Enhanced Axon Growth in Transected Spinal Cords // *Tissue Eng. Part A*. 2017. Vol. 23, № 9–10. P. 415–425.
38. Kaplan B. et al. Rapid prototyping fabrication of soft and oriented polyester scaffolds for axonal guidance // *Biomaterials*. 2020. Vol. 251. P. 120062.
39. Xie R. et al. Engineering of Hydrogel Materials with Perfusable Microchannels for Building Vascularized Tissues // *Small*. 2020. Vol. 16, № 15. P. 1902838.
40. Hu Y. et al. Scaffolds with anisotropic structure for neural tissue engineering // *Eng. Regen.* 2022. Vol. 3, № 2. P. 154–162.
41. Saltzman E.B. et al. A Comparison Between Two Collagen Nerve Conduits and Nerve Autograft: A Rat Model of Motor Nerve Regeneration // *J. Hand Surg. Am.* 2019. Vol. 44, № 8. P. 700.e1-700.e9.
42. Hou Y. et al. Repairing Transected Peripheral Nerve Using a Biomimetic Nerve Guidance Conduit Containing Intraluminal Sponge Fillers // *Adv. Healthc. Mater.* 2019. Vol. 8, № 21. P. 1900913.
43. García-Medrano B. et al. Reparación de lesiones en nervios mediante el implante de prótesis obtenidas de segmentos acelulares de nervio isogénico // *Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.* 2017. Vol. 61, № 5. P. 359–366.

44. Faroni A. et al. Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015. Vol. 82–83. P. 160–167.
45. Balakrishnan A. et al. Insights Into the Role and Potential of Schwann Cells for Peripheral Nerve Repair From Studies of Development and Injury // *Front. Mol. Neurosci.* 2021. Vol. 13.
46. Cerqueira S.R. et al. Decellularized peripheral nerve supports Schwann cell transplants and axon growth following spinal cord injury // *Biomaterials.* 2018. Vol. 177. P. 176–185.
47. Tajdaran K. et al. Matrices, scaffolds, and carriers for protein and molecule delivery in peripheral nerve regeneration // *Exp. Neurol.* 2019. Vol. 319. P. 112817.
48. Giannaccini M. et al. Magnetic Nanoparticles for Efficient Delivery of Growth Factors: Stimulation of Peripheral Nerve Regeneration // *Adv. Healthc. Mater.* 2017. Vol. 6, № 7. P. 1601429.
49. Lu P. et al. Promotion of Survival and Differentiation of Neural Stem Cells with Fibrin and Growth Factor Cocktails after Severe Spinal Cord Injury // *J. Vis. Exp.* 2014. № 89.
50. García-Medrano B. et al. Repair of nerve injury by implanting prostheses obtained from isogenic acellular nerve segments // *Rev. Española Cirugía Ortopédica y Traumatol. (English Ed.)* 2017. Vol. 61, № 5. P. 359–366.
51. Stokols S. et al. Templated Agarose Scaffolds Support Linear Axonal Regeneration // *Tissue Eng.* 2006. Vol. 12, № 10. P. 2777–2787.
52. Zuidema J.M. et al. Porous Silicon Nanoparticles Embedded in Poly(lactic- co - glycolic acid) Nanofiber Scaffolds Deliver Neurotrophic Payloads to Enhance Neuronal Growth // *Adv. Funct. Mater.* 2020. Vol. 30, № 25. P. 2002560.
53. Kennedy K.M., Bhaw-Luximon A., Jhurry D. Cell-matrix mechanical interaction in electrospun polymeric scaffolds for tissue engineering: Implications for scaffold design and performance // *Acta Biomater.* 2017. Vol. 50. P. 41–55.

54. Zhang J. et al. Conductive Composite Fiber with Optimized Alignment Guides Neural Regeneration under Electrical Stimulation // *Adv. Healthc. Mater.* 2021. Vol. 10, № 3. P. 2000604.
55. Jiang X. et al. Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits // *Exp. Neurol.* 2010. Vol. 223, № 1. P. 86–101.
56. Campbell W.W. Evaluation and management of peripheral nerve injury // *Clin. Neurophysiol.* 2008. Vol. 119, № 9. P. 1951–1965.
57. Moore A.M. et al. Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: A comparative study // *Muscle Nerve.* 2011. Vol. 44, № 2. P. 221–234.
58. Park J. et al. Electrically Conductive Hydrogel Nerve Guidance Conduits for Peripheral Nerve Regeneration // *Adv. Funct. Mater.* 2020. Vol. 30, № 39. P. 2003759.
59. Huang J. et al. Electrical regulation of Schwann cells using conductive polypyrrole/chitosan polymers // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2009. Vol. 9999A. P. NA-NA.
60. Magaz A. et al. Graphene oxide and electroactive reduced graphene oxide-based composite fibrous scaffolds for engineering excitable nerve tissue // *Mater. Sci. Eng. C.* 2021. Vol. 119. P. 111632.
61. Sakuma M. et al. Chronic Electrical Nerve Stimulation as a Therapeutic Intervention for Peripheral Nerve Repair // *Bioelectron. Med.* 2015. Vol. 2, № 1. P. 43–48.
62. Sherratt R.M., Bostock H., Sears T.A. Effects of 4-aminopyridine on normal and demyelinated mammalian nerve fibres // *Nature.* 1980. Vol. 283, № 5747. P. 570–572.
63. Davis F.A., Stefoski D., Rush J. Orally administered 4-aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis // *Ann. Neurol.* 1990. Vol. 27, № 2. P. 186–192.
64. HANSEBOUT R.R. et al. 4-Aminopyridine in Chronic Spinal Cord Injury: A Controlled, Double-Blind, Crossover Study in Eight Patients // *J. Neurotrauma.* 1993. Vol. 10, № 1. P. 1–18.

65. Haider A. et al. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review // *RSC Adv.* 2017. Vol. 7, № 13.
66. Wang K. et al. Study of protein adsorption on octacalcium phosphate surfaces by molecular dynamics simulations // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2012. Vol. 23, № 4. P. 1045–1053.
67. Zima A. Hydroxyapatite-chitosan based bioactive hybrid biomaterials with improved mechanical strength // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018. Vol. 193. P. 175–184.
68. Alemán J. V. et al. Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC Recommendations 2007) // *Pure Appl. Chem.* 2007. Vol. 79, № 10. P. 1801–1829.
69. Patrulea V. et al. Chitosan as a starting material for wound healing applications // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015. Vol. 97. P. 417–426.
70. Ying R. et al. Preparation and properties of a highly dispersed nano-hydroxyapatite colloid used as a reinforcing filler for chitosan // *Mater. Sci. Eng. C.* 2020. Vol. 110. P. 110689.
71. Ying R.-L. et al. Synthesis of ultralong hydroxyapatite micro/nanoribbons and their application as reinforcement in collagen scaffolds for bone regeneration // *Ceram. Int.* 2019. Vol. 45, № 5. P. 5914–5921.
72. Sikder P., Ren Y., Bhaduri S.B. Microwave processing of calcium phosphate and magnesium phosphate based orthopedic bioceramics: A state-of-the-art review // *Acta Biomater.* 2020. Vol. 111.
73. Kaynak Bayrak G., Demirtaş T.T., Gümüşderelioğlu M. Microwave-induced biomimetic approach for hydroxyapatite coatings of chitosan scaffolds // *Carbohydr. Polym.* 2017. Vol. 157.
74. Sukhodub L.B. et al. C60 fullerene loaded hydroxyapatite-chitosan beads as a promising system for prolonged drug release // *Carbohydr. Polym.* 2019. Vol. 223.

75. Hassan M.N. et al. Microwave-assisted preparation of Nano-hydroxyapatite for bone substitutes // *Ceram. Int.* 2016. Vol. 42, № 3.
76. Kumeda M.O., Sukhodub L.F. The effect of microwave irradiation on the synthesis of hydroxyapatite/biopolymer nanocomposites // *Him. Fiz. ta Tehnol. Poverhni.* 2021. Vol. 12, № 3. P. 201–215.
77. Yang X. et al. Facile Synthesis of Octacalcium Phosphate Nanobelts: Growth Mechanism and Surface Adsorption Properties // *J. Phys. Chem. C.* 2010. Vol. 114, № 14.
78. Elliott J.C. Calcium Phosphate Biominerals // *Rev. Mineral. Geochemistry.* 2002. Vol. 48, № 1.
79. Shen D. et al. Synthesis and enhanced bone regeneration of carbonate substituted octacalcium phosphate // *Biomed. Mater. Eng.* 2017. Vol. 28, № 1.
80. Stanislavov A.S. et al. Structural features of hydroxyapatite and carbonated apatite formed under the influence of ultrasound and microwave radiation and their effect on the bioactivity of the nanomaterials // *Ultrason. Sonochem.* 2018. Vol. 42.
81. Bian J.-J., Kim D.-W., Hong K.-S. Phase transformation and sintering behavior of $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ // *Mater. Lett.* 2004. Vol. 58, № 3–4.
82. Cheng J. et al. The physicochemical properties of chitosan prepared by microwave heating // *Food Sci. Nutr.* 2020. Vol. 8, № 4.
83. Venkatesan J. et al. Alginate composites for bone tissue engineering: A review // *Int. J. Biol. Macromol.* 2015. Vol. 72. P. 269–281.
84. Zima A. Hydroxyapatite-chitosan based bioactive hybrid biomaterials with improved mechanical strength // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018. Vol. 193.
85. Kyzas G.Z., Bikiaris D.N., Lazaridis N.K. Low-Swelling Chitosan Derivatives as Biosorbents for Basic Dyes // *Langmuir.* 2008. Vol. 24, № 9.
86. Deftos L.J. Bone protein and peptide assays in the diagnosis and management of skeletal disease // *Clin Chem.* 1991. Vol. 37, № 7. P. 1143–1148.

87. Costa P., Sousa Lobo J.M. Modeling and comparison of dissolution profiles // Eur. J. Pharm. Sci. 2001. Vol. 13, № 2.
88. Zhang P.-X. et al. Tissue engineering for the repair of peripheral nerve injury // Neural Regen. Res. 2019. Vol. 14, № 1.
89. Yan Y. et al. Implantable nerve guidance conduits: Material combinations, multi-functional strategies and advanced engineering innovations // Bioact. Mater. 2022. Vol. 11. P. 57–76.
90. Venkatesan J. et al. Alginate composites for bone tissue engineering: A review // Int. J. Biol. Macromol. 2015. Vol. 72.
91. Farokhi M. et al. Prospects of peripheral nerve tissue engineering using nerve guide conduits based on silk fibroin protein and other biopolymers // Int. Mater. Rev. 2017. Vol. 62, № 7. P. 367–391.
92. Seckel B.R., Chiu T.H., Sidman R.L. Nerve Regeneration through Synthetic Biodegradable Nerve Guides // Plast. Reconstr. Surg. 1984. Vol. 74, № 2. P. 173–181.
93. Yi H. et al. Biofabrication with Chitosan // Biomacromolecules. 2005. Vol. 6, № 6. P. 2881–2894.
94. Nawrotek K. et al. Chitosan-based hydrogel implants enriched with calcium ions intended for peripheral nervous tissue regeneration // Carbohydr. Polym. 2016. Vol. 136.
95. Zheng F. et al. The electrostimulation and scar inhibition effect of chitosan/oxidized hydroxyethyl cellulose/reduced graphene oxide/asiaticoside liposome based hydrogel on peripheral nerve regeneration in vitro // Mater. Sci. Eng. C. 2020. Vol. 109. P. 110560.
96. Gordon T. Electrical Stimulation to Enhance Axon Regeneration After Peripheral Nerve Injuries in Animal Models and Humans // Neurotherapeutics. 2016. Vol. 13, № 2. P. 295–310.
97. Chen X. et al. Electrospinning Multilayered Scaffolds Loaded with Melatonin and Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles for Peripheral Nerve Regeneration // Adv. Funct. Mater. 2020. Vol. 30, № 38. P. 2004537.

98. Zuidema J.M. et al. Magnetic NGF-Releasing PLLA/Iron Oxide Nanoparticles Direct Extending Neurites and Preferentially Guide Neurites along Aligned Electrospun Microfibers // *ACS Chem. Neurosci.* 2015. Vol. 6, № 11. P. 1781–1788.
99. Monfared A., Ghaee A., Ebrahimi-Barough S. Fabrication of tannic acid/poly(N-vinylpyrrolidone) layer-by-layer coating on Mg-based metallic glass for nerve tissue regeneration application // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2018. Vol. 170. P. 617–626.
100. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon // *Nature.* 1991. Vol. 354, № 6348. P. 56–58.
101. White A.A., Best S.M., Kinloch I.A. Hydroxyapatite/Carbon Nanotube Composites for Biomedical Applications: A Review // *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 2007. Vol. 4, № 1. P. 1–13.
102. Li A. et al. Mechanical properties, microstructure and histocompatibility of MWCNTs/HAp biocomposites // *Mater. Lett.* 2007. Vol. 61, № 8–9. P. 1839–1844.
103. Thomsen C., Reich S., Maultzsch J. *Carbon Nanotubes.* Wiley, 2004.
104. Markovic Z., Trajkovic V. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀) // *Biomaterials.* 2008. Vol. 29, № 26.
105. Foote C.S. Photophysical and photochemical properties of fullerenes. 1994. P. 347–363.
106. Gharbi N. et al. [C₆₀]Fullerene is a Powerful Antioxidant in Vivo with No Acute or Subacute Toxicity // *Nano Lett.* 2005. Vol. 5, № 12.
107. Yudoh K. Water-soluble fullerene (C₆₀) inhibits the osteoclast differentiation and bone destruction in arthritis // *Int. J. Nanomedicine.* 2009.
108. Lyon D.Y. et al. Antibacterial Activity of Fullerene Water Suspensions: Effects of Preparation Method and Particle Size // *Environ. Sci. Technol.* 2006. Vol. 40, № 14. P. 4360–4366.

109. Fortner J.D. et al. C₆₀ in Water: Nanocrystal Formation and Microbial Response // *Environ. Sci. Technol.* 2005. Vol. 39, № 11. P. 4307–4316.
110. Penkova A. V et al. Fullerene derivatives as nano-additives in polymer composites // *Russ. Chem. Rev.* 2017. Vol. 86, № 6. P. 530–566.
111. Safari J., Zarnegar Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review // *J. Saudi Chem. Soc.* 2014. Vol. 18, № 2. P. 85–99.
112. Kam N.W.S. et al. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. Vol. 102, № 33. P. 11600–11605.
113. Tran P.A., Zhang L., Webster T.J. Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009. Vol. 61, № 12. P. 1097–1114.
114. KAWAGUCHI M. et al. Preparation of Carbon Nanotube-alginate Nanocomposite Gel for Tissue Engineering // *Dent. Mater. J.* 2006. Vol. 25, № 4. P. 719–725.
115. Khan A.S. et al. Fabrication and in vivo evaluation of hydroxyapatite/carbon nanotube electrospun fibers for biomedical/dental application // *Mater. Sci. Eng. C.* 2017. Vol. 80. P. 387–396.
116. Kumar S. et al. Carbon nanotubes: a novel material for multifaceted applications in human healthcare // *Chem. Soc. Rev.* 2017. Vol. 46, № 1. P. 158–196.
117. Prylutska S. et al. Effect of iron-doped multi-walled carbon nanotubes on lipid model and cellular plasma membranes // *Mater. Sci. Eng. C.* 2012. Vol. 32, № 6.
118. Matyshevska O.P. et al. Self-organizing DNA/carbon nanotube molecular films // *Mater. Sci. Eng. C.* 2001. Vol. 15, № 1–2. P. 249–252.
119. Marchesan S., Melchionna M., Prato M. Carbon Nanostructures for Nanomedicine: Opportunities and Challenges // *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures.* 2014. Vol. 22, № 1–3. P. 190–195.

120. Price R.L. et al. Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers // *Biomaterials*. 2003. Vol. 24, № 11. P. 1877–1887.
121. Scharff P. et al. Effect of X-Ray and UV irradiation of the C60 fullerene aqueous solution on biological samples // *Carbon N. Y.* 2004. Vol. 42, № 5–6.
122. Sukhodub L.B. et al. Single-walled carbon nanotubes loaded hydroxyapatite–alginate beads with enhanced mechanical properties and sustained drug release ability // *Prog. Biomater.* 2020. Vol. 9, № 1–2. P. 1–14.
123. Rowley J.A., Madlambayan G., Mooney D.J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials // *Biomaterials*. 1999. Vol. 20, № 1. P. 45–53.
124. Zarrintaj P. et al. A facile route to the synthesis of anilinic electroactive colloidal hydrogels for neural tissue engineering applications // *J. Colloid Interface Sci.* 2018. Vol. 516. P. 57–66.
125. Homaeigohar S. et al. An electroactive alginate hydrogel nanocomposite reinforced by functionalized graphite nanofilaments for neural tissue engineering // *Carbohydr. Polym.* 2019. Vol. 224. P. 115112.
126. Vandghanooni S., Eskandani M. Electrically conductive biomaterials based on natural polysaccharides: Challenges and applications in tissue engineering // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 141. P. 636–662.
127. Qu J. et al. Biocompatible conductive hydrogels based on dextran and aniline trimer as electro-responsive drug delivery system for localized drug release // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 140. P. 255–264.
128. Liu P. et al. Ionic liquid functionalized non-releasing antibacterial hydrogel dressing coupled with electrical stimulation for the promotion of diabetic wound healing // *Chem. Eng. J.* 2021. Vol. 415. P. 129025.