

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

Багров Дмитрий Владимирович

**Формирование и визуализация  
субмикронных полимерных волокон**

Специальность 1.4.7. Высокомолекулярные соединения

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

доктора физико-математических наук

Научный консультант

доктор физико-математических наук

профессор Шайтан Константин Вольдемарович

Москва – 2026

## Оглавление

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Введение .....                                                                                                               | 6  |
| 1. Обзор литературы .....                                                                                                    | 14 |
| 1.1. Общие сведения о способах получения полимерных волокон .....                                                            | 14 |
| 1.1.1. Механическая вытяжка .....                                                                                            | 15 |
| 1.1.2. Экструзия .....                                                                                                       | 24 |
| 1.1.3. Электроформование .....                                                                                               | 29 |
| 1.1.4. Самоорганизация и самосборка .....                                                                                    | 40 |
| 1.1.5. Специфические методы формирования тонких волокон .....                                                                | 47 |
| 1.2. Особенности структуры и применений электроформованных волокон ...                                                       | 55 |
| 1.2.1. Использование электроформованных мембран в регенеративной<br>медицине .....                                           | 55 |
| 1.2.2. Электроформованные мембраны сложного состава .....                                                                    | 57 |
| 1.2.3. Использование электроформованных мембран в задачах фильтрации, а<br>также в биологических и химических сенсорах ..... | 63 |
| 2. Экспериментальное исследование субмикронных волокон, сформированных<br>различными способами .....                         | 71 |
| 2.1. Материалы и методы .....                                                                                                | 71 |
| 2.1.1. Пептиды RADA-16-I и RLDL-16-I .....                                                                                   | 71 |
| 2.1.2. Метакрилированные белки .....                                                                                         | 71 |
| 2.1.3. Крейзинг полимеров в адсорбционно-активной среде .....                                                                | 72 |
| 2.1.4. Атомно-силовая микроскопия .....                                                                                      | 72 |
| 2.1.5. Просвечивающая электронная микроскопия .....                                                                          | 73 |
| 2.1.6. Растворы для электроспиннинга .....                                                                                   | 73 |
| 2.1.7. Электроспиннинг .....                                                                                                 | 74 |
| 2.1.8. Сканирующая электронная микроскопия .....                                                                             | 74 |
| 2.2. Получение субмикронных волокон методом самоорганизации .....                                                            | 75 |
| 2.3. Фотополимеризация метакрилированных белков .....                                                                        | 81 |
| 2.4. Крейзинг полимеров в адсорбционно-активной среде .....                                                                  | 84 |

|        |                                                                                                  |     |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.4.1. | Технические особенности сканирования полимерных пленок на воздухе и в жидкости .....             | 85  |
| 2.4.2. | Методика визуализации поверхности полимеров, деформированных по механизму крейзинга .....        | 90  |
| 2.4.3. | Усадка полимера, растянутого по механизму крейзинга.....                                         | 94  |
| 2.5.   | Электроформованные мембраны из различных полимеров .....                                         | 98  |
| 3.     | Корреляционная микроскопия и ее применение для исследования электроформованных мембран.....      | 105 |
| 3.1.   | Материалы и методы .....                                                                         | 105 |
| 3.1.1. | Электроформование.....                                                                           | 105 |
| 3.1.2. | Измерения методом корреляционной микроскопии .....                                               | 106 |
| 3.2.   | Принцип корреляционной микроскопии .....                                                         | 106 |
| 3.3.   | Особенности анализа данных в корреляционной микроскопии .....                                    | 113 |
| 3.4.   | Разработка структурной модели электроформованной мембраны.....                                   | 115 |
| 4.     | Многокомпонентные электроформованные мембраны .....                                              | 124 |
| 4.1.   | Материалы и методы .....                                                                         | 124 |
| 4.1.1. | Приготовление смесей и электроформование .....                                                   | 124 |
| 4.1.2. | Сканирующая электронная микроскопия и элементный анализ .....                                    | 124 |
| 4.1.3. | Оптическая микроскопия и КР-микроспектроскопия.....                                              | 125 |
| 4.1.4. | Измерения краевого угла смачивания .....                                                         | 125 |
| 4.1.5. | Кинетика растворения мембран .....                                                               | 125 |
| 4.2.   | Общие замечания об использовании полимер-белковых смесей в электроформовании .....               | 126 |
| 4.3.   | Растворимость и смачиваемость мембран, изготовленных из полимер-белковых смесей .....            | 130 |
| 4.4.   | Взаимосвязь между составом полимер-белковых мембран и их структурой .....                        | 137 |
| 4.5.   | Однородность электроформованных полимер-белковых волокон и контроль их химического состава ..... | 141 |

|        |                                                                                        |     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.     | Формирование ориентированных мембран.....                                              | 153 |
| 5.1.   | Материалы и методы .....                                                               | 153 |
| 5.1.1. | Электроформование.....                                                                 | 153 |
| 5.1.2. | Измерение направлений волокон .....                                                    | 153 |
| 5.1.3. | Обработка мембран спиртом .....                                                        | 154 |
| 5.1.4. | Культирование клеток на мембранах .....                                                | 154 |
| 5.1.5. | Визуализация клеток методом КЛСМ .....                                                 | 155 |
| 5.1.6. | Визуализация клеток методом СЭМ.....                                                   | 155 |
| 5.1.7. | Механические испытания электроформованных мембран.....                                 | 155 |
| 5.1.8. | Рентгеноструктурный анализ .....                                                       | 156 |
| 5.2.   | Получение ориентированных субмикронных волокон.....                                    | 156 |
| 5.3.   | Методические особенности, связанные с визуализацией клеток на мембранах .....          | 163 |
| 5.4.   | Контактное ориентирование клеток на поверхности электроформованных мембран .....       | 166 |
| 6.     | Использование электроформованных мембран в биосенсорах.....                            | 172 |
| 6.1.   | Материалы и методы .....                                                               | 172 |
| 6.1.1. | Электроформованные мембраны .....                                                      | 172 |
| 6.1.2. | Пропускание растворов через мембрану из ПДО.....                                       | 172 |
| 6.1.3. | Измерение неспецифической адсорбции БСА на мембрану из ПДО..                           | 174 |
| 6.1.4. | Измерение специфического связывания .....                                              | 175 |
| 6.1.5. | Измерение концентрации мелатонина методом ИФА и дот-блоттинг                           | 176 |
| 6.1.6. | Моделирование адсорбции аналита на мембрану .....                                      | 178 |
| 6.2.   | Исследование адсорбции БСА на волокна ПДО .....                                        | 179 |
| 6.3.   | Использование мембраны на основе ПДО как элемента биосенсора.....                      | 188 |
| 6.4.   | Электроформованные мембраны из нитроцеллюлозы и их использование в иммуноанализе ..... | 195 |
|        | Результаты и выводы .....                                                              | 199 |
|        | Заключение.....                                                                        | 201 |

|                                            |     |
|--------------------------------------------|-----|
| Благодарности.....                         | 203 |
| Список публикаций по теме диссертации..... | 204 |
| Список литературы.....                     | 210 |
| Список сокращений и обозначений.....       | 241 |

## **Введение**

### **Актуальность темы исследования**

Волокнистые структуры широко распространены как в природных, так и в искусственных материалах. Способность формировать волокна и нити является отличительным свойством полимеров. С точки зрения химии, большинство волокон представляют собой полимеры или композиты на их основе, тогда как количество и разнообразие волокон из низкомолекулярных соединений сравнительно невелико (прежде всего это углеродные и минеральные волокна).

Среди волокнистых структур особый интерес представляют наиболее тонкие (с диаметром от нескольких нанометров до нескольких микрометров). Благодаря высокой удельной поверхности и специфическим свойствам, в частности термическим, механическим и биологическим, они рассматриваются как перспективный класс функциональных материалов. Они используются для фильтрации жидкостей и газов, а также для изготовления специализированных электродов, сенсоров, сорбентов, носителей для лекарств и раневых покрытий. Значительный интерес к ним возник на фоне развития тканевой инженерии, поскольку с точки зрения морфологии, внеклеточный матрикс мягких тканей млекопитающих представляет собой волокнистую структуру, состоящую из нанофибрилл. Дополнительным фактором, усилившим внимание научного сообщества к субмикронным полимерным фибриллам, было интенсивное развитие нанотехнологий в начале XXI века и связанное с этим развитие микроскопии высокого разрешения. Детальное исследование морфологии, пространственной организации и размеров фибрилл позволяет установить взаимосвязь между структурой волокнистых материалов и их макроскопическими свойствами. Это необходимо для развития их приложений – от традиционных фильтров до наиболее современных сенсоров и искусственных органов.

Одним из наиболее популярных и широко используемых способов получения субмикронных волокон является электроформование (электроспиннинг) – изготовление полимерных волокон в сильном электрическом поле. Этот метод был разработан в середине XX века академиком И.В. Петряновым-Соколовым и использовался для производства воздушных фильтров. В начале XXI века интерес к этому методу стал стремительно расти во всем мире – прежде всего в контексте биомедицинских исследований. В связи с этим актуальной научной задачей является систематическое исследование субмикронных

полимерных волокон как особого класса структурированных полимерных материалов, анализ места электроформования в системе методов их получения, а также развитие методов визуализации и количественного анализа их морфологии.

### **Степень разработанности темы исследования**

Изучение полимерных волокон как материалов для изготовления тканей имеет многовековую историю, а субмикронные волокна стали объектом пристального внимания мирового научного сообщества в конце XX – начале XXI века. Это во многом связано с развитием методов визуализации, прежде всего электронной и зондовой микроскопии, которые позволили быстро и точно получать изображения нановолокон, измерять их размеры и, следовательно, определять условия их формирования и стабильности.

Многие материалы и устройства, содержащие субмикронные полимерные фибриллы, уже применяются на практике. Например, тонкие электроформованные нити используются в воздушных фильтрах и в раневых покрытиях из биосовместимых полимеров. Полипропиленовые мембраны, полученные методом вытяжки и содержащие поры, границы которых представляют собой нанофибриллы, применяются в литий-ионных батареях. Гидрогели, состоящие из нанофибрилл биосовместимых полимеров, образующихся в результате спонтанной агрегации (самосборки), применяются в качестве хирургических и косметических филлеров. Однако, несмотря на обширный опыт применения, многие фундаментальные и технологические свойства тонких полимерных фибрилл и волокон остаются недостаточно изученными. Некоторые процедуры визуализации, необходимые для их исследования, сопряжены с возникновением артефактов как на этапе подготовки образцов, так и в процессе измерений. Совершенствование соответствующих методик является необходимым условием для количественного анализа волокнистых структур и условий их формирования.

Возможности варьирования состава и создания многокомпонентных волокон представляют интерес с точки зрения управления их свойствами: кинетикой деградации, эластичностью, смачиваемостью и другими. Особый интерес представляют системы, в которых одной из компонент является белок, поскольку внесение белков в состав тканеинженерных конструкций позволяет расширить их функциональность. Технологические аспекты введения белков в состав волокон, а также вопросы

однородности их структуры, стабильности и кинетики высвобождения белков являются предметом активного изучения.

Наиболее известное применение электроформованных мембран в биомедицине связано с моделированием внеклеточного матрикса. Однако в последние годы их стали также использовать в качестве компонент биологических и химических сенсоров. Возможности и перспективы этого направления пока освещены сравнительно слабо и требуют дальнейшего изучения.

В целом, электроформование часто рассматривают как практически безальтернативный метод изготовления субмикронных полимерных волокон. Это обусловлено его гибкостью и широкой распространенностью; в то же время его практически не обсуждают в контексте альтернативных методов.

**Цель работы:** создать комплекс подходов к формированию и визуализации субмикронных полимерных волокон, с особым вниманием к электроформованию как наиболее актуальному подходу, а также расширить его возможности и области применения.

#### **Задачи**

1. Определить место электроформования среди других методов изготовления тонких полимерных волокон, таких как самосборка, селективное фотоотверждение, механическая вытяжка. Продемонстрировать применимость электроформования для синтетических и природных полимеров, а также их смесей.
2. Разработать процедуры визуализации, основанные на методах микроскопии высокого разрешения (АСМ, СЭМ, ПЭМ, КЛСМ), оптимальные для каждого типа исследуемых объектов – субмикронных полимерных волокон в суспензиях, а также волокнистых и фибриллярно-пористых пленок.
3. Для различных полимеров и полимер-белковых смесей определить взаимосвязь между их химическим составом и морфологией электроформованных волокон; предложить способы получения ориентированных электроформованных волокон.
4. Определить влияние введения белка в состав электроформованных мембран на основе полиэфилов на их однородность и растворимость.
5. Экспериментально подтвердить применимость созданных электроформованных мембран в качестве субстратов для культивирования клеток и элементов биосенсоров.

### **Научная новизна**

1. Предложен методический подход к исследованию поверхности полимеров, деформированных по механизму крейзинга в адсорбционно-активной среде, *in situ*. С помощью атомно-силовой микроскопии количественно описана фибриллярно-пористая структура, возникающая при деформации полиэтилена высокой плотности (ПЭВП), а также выявлены ее изменения, происходящие при удалении среды и при релаксации механического напряжения.
2. Для детального определения морфологии, размеров и расположения субмикронных волокон на поверхности и в объеме электроформованных мембран впервые использована корреляционная микроскопия, объединяющая сканирующую электронную и конфокальную микроскопию (СЭМ-КЛСМ).
3. Доказано, что при электроформовании гетерогенной смеси полимера и белка, приготовленной в общем растворителе, возможно совмещение компонент в одном субмикронном волокне, несмотря на их термодинамическую несовместимость; это экспериментально продемонстрировано для смесей полилактида с желатином и полилактида с альбумином.
4. Для изготовления ориентированных электроформованных волокон разработан метод их получения путем вытяжки в пластификаторе, который оказался более эффективным, чем традиционный «метод зазора» (для полилактида ориентационные факторы составили 0.92 и 0.7 соответственно).
5. Для повышения чувствительности биосенсоров впервые количественно сопоставлены закономерности осаждения аналитов на электроформованную мембрану при инкубации мембраны в растворе и при направленном пропускании раствора через нее. Количество адсорбированного вещества возрастало в 2.8-11.5 раза в случае неспецифического связывания и в 2.4-3.4 раза в случае специфического; предложена теоретическая модель для описания диффузии аналита в мембране и его адсорбции.

### **Теоретическая значимость работы**

Алгоритм создания цифровых моделей электроформованных мембран и соответствующая компьютерная программа могут быть использованы для определения

взаимосвязей между структурными характеристиками мембраны, а также для создания синтетических изображений, полученных с помощью микроскопии высокого разрешения.

Теоретическая модель диффузии-адсорбции, описывающая адсорбцию аналита на мембрану из движущегося раствора, может быть полезна для оптимизации конструкции и режимов эксплуатации мембранных биосенсоров.

### **Практическая значимость работы**

Подходы к визуализации субмикронных волокон, предложенные в данной работе, могут применяться в фундаментальных и прикладных исследованиях широкого класса нано- и микрообъектов, включая природные и синтетические наноструктуры.

Биоразлагаемые электроформованные мембраны, изготовленные в данной работе, могут использоваться в задачах тканевой инженерии, в частности, для изготовления искусственной кожи.

Электроформованные мембраны, состоящие из ориентированных волокон, являются модельной системой для определения реакции эукариотических клеток на анизотропную подложку и исследования контактного ориентирования.

Адаптированный протокол подготовки клеток к исследованию методом СЭМ, использующий ГМДС, может применяться для определения морфологии клеток, выращенных на полимерных субстратах, чувствительных к ацетону.

### **Методология и методы исследования**

Методы изготовления тонких полимерных волокон, использованные в работе, включали самосборку (с ее помощью получали нанофибриллы пептида RADA-16-I), селективное фотоотверждение (с его помощью получали структуры из метакрилированных белков), электроспиннинг (электроформование) и крейзинг в адсорбционно-активной среде (с его помощью формировали нанофибриллы ПЭВП, ПП и ПКЛ). Основным методом был выбран электроспиннинг – его применяли для изготовления волокон из широкого спектра полимеров, а именно: различных полиэфиров, нейлонов, белков, нитроцеллюлозы, а также смесей полиэфиров и белков, приготовленных в одном растворителе.

В работе использованы различные методы микроскопии: сканирующая электронная (СЭМ), просвечивающая электронная (ПЭМ), атомно-силовая (АСМ), широкопольная флуоресцентная, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ), а также КР-микроспектроскопия. Кроме того, предложена процедура корреляционной микроскопии,

которая позволяет исследовать одну и ту же область образца двумя методами последовательно (СЭМ и КЛСМ). Особенность экспериментов, выполненных с помощью СЭМ, состояла в том, что большинство из них проводилось без напыления металла на исследуемый образец, при малом токе электронного пучка. Эксперименты, выполненные с помощью АСМ, имели две методические особенности. В части исследования тонких пептидных фибрилл использовались сверхострые кантилеверы, а при исследовании полимеров, деформированных по механизму крейзинга, измерения проводились на поверхности пленки, находящейся под нагрузкой, в жидкости.

Кроме различных методов визуализации, в работе использованы следующие методы: построение фазовой диаграммы трехкомпонентной системы методом точки помутнения, механические испытания на разрыв, измерения краевого угла смачивания методом лежащей капли, определение кинетики деградации по измерению массы.

В части исследования биосовместимости электроформованных мембран использованы методы клеточной биологии, а при рассмотрении их как компонент биосенсоров – метод иммуноферментного анализа.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Предложенный в работе комплекс методов формирования и визуализации субмикронных полимерных волокон позволяет изготавливать их из различных по химической структуре полимеров: полиэфиров, нейлонов, полиолефинов, а также некоторых белков и пептидов.

2. Оригинальная процедура визуализации полимерных пленок, находящихся в растянутом состоянии, с помощью атомно-силового микроскопа, позволяет количественно охарактеризовать нативную фибриллярно-пористую структуру крейзованных полимеров; наблюдаемая структура изменяется при удалении адсорбционно-активной среды или механической нагрузки.

3. Корреляционная микроскопия, сочетающая методы сканирующей электронной и конфокальной микроскопии, позволяет получить наиболее полную информацию о структуре электроформованных мембран как на поверхности, так и в объеме.

4. Методы КР-спектроскопии, рентгеновского микроанализа и флуоресцентной микроскопии показывают, что при применении электроформования к несовместимой смеси

полимера и белка, приготовленной в общем растворителе, можно совместить их в одном субмикронном волокне.

5. Растяжение электроформованной мембраны в пластификаторе позволяет более эффективно ориентировать волокна, чем традиционный «метод зазора»; параллельно уложенные электроформованные волокна могут использоваться для контактного ориентирования клеток.

6. Адсорбция молекул белка на волокна электроформованной мембраны происходит более интенсивно, если прокачивать раствор через нее под давлением, чем при инкубации мембраны в растворе. Эта закономерность проявляется и при неспецифической адсорбции, и при специфическом связывании (при наличии специфических антител на поверхности волокон), и может использоваться в разработке биосенсоров.

### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены и обсуждены на следующих конференциях и семинарах:

Первый российский кристаллографический конгресс (Москва, 2016), Восьмая международная конференция «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, 2016), VII Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры – 2017» (Москва, 2017), Четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии» (Москва, 2018), Итоговая научно-практическая конференция ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (Москва, 2018), Пятый междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии» (Москва, 2019), конференция «Ломоносовские чтения – 2019» (Москва, 2019), конференция «Biomaterials for Cell and Drug Delivery» (Великобритания, Манчестер, 2019), конференция «UK-Russia Bioinspired materials conference» (Великобритания, Ланкастер, 2020), Школа-конференция молодых учёных ИОФ РАН «Прохоровские недели» (Москва, 2021), конференция «Клиническая диагностика и персонализированная медицина» (Москва, 2022), 4-я Международная школа-конференция «Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем – 2022» (Москва, 2022), конференция «Ломоносовские чтения – 2023» (Москва, 2023), Всероссийская конференция «Биомедицинская химия: наука и практика» (Москва, 2024), X Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции» (Москва,

2024), Школа-конференция «Инженерия живых систем – достижения и перспективы» (Москва, 2025).

### **Публикации**

Основное содержание работы опубликовано в 34 статьях, включая 33 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в международных базах данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и удовлетворяющих «Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова».

### **Личный вклад автора**

Все исследования, вошедшие в данную работу, были выполнены либо самим диссертантом, либо в соавторстве с диссертантом в рамках совместных проектов, либо под его непосредственным руководством, в том числе в рамках проектов Российского научного фонда.

Работа с пептидом RADA-16-I выполнена совместно с И.П.Удовиченко и А.П.Данилковичем (ФИБХ РАН, Пушкино) и Ю.С.Газизовой (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России имени Ю.М.Лопухина). Работы по исследованию фибриллярно-пористых полимеров, деформированных по механизму крейзинга, были выполнены совместно с А.Ю.Ярышевой и другими сотрудниками лаборатории А.Л.Волынского (Химический факультет МГУ). Упорядоченные структуры, сформированные с помощью селективного фотоотверждения, были изготовлены И.В.Бессоновым (ПАО «Эфферон») и научной группой М.М.Мойсеновича (Биологический факультет МГУ). Эксперименты по электроформованию (получение ориентированных и смесевых волокон) были выполнены совместно с Е.Р.Павловой и другими сотрудниками лаборатории Д.В.Клинова (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России имени Ю.М.Лопухина). Разработка методики корреляционной микроскопии выполнена совместно с А.М.Мойсенович (Биологический факультет МГУ). Теоретический анализ диффузии-адсорбции выполнен совместно с К.А.Прусаковым (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России имени Ю.М.Лопухина). Эксперименты по иммуноанализу выполнены А.А.Маслаковой, А.Е.Сидоровой и С.В.Замалутдиновой (Биологический факультет МГУ) под руководством автора.

## 1. Обзор литературы

### 1.1. Общие сведения о способах получения полимерных волокон

История изготовления и использования волокон известна с древнейших времен: хлопковые, льняные и шерстяные волокна известны очень давно, и их практическую значимость сложно переоценить. Полимерные волокна обычно делят на естественные (натуральные, полученные из природного сырья), искусственные (также полученные из природного сырья, но прошедшего химическую модификацию), и синтетические [1]. Для примера в качестве представителей каждого из указанных классов можно привести шерсть (естественное волокно), ацетатное волокно (его получают из химически модифицированной целлюлозы) и полипропиленовые волокна (полностью синтетические).

Способность к формированию волокон и нитей иногда считается одной из характеристических черт полимеров. Из этой закономерности есть исключения: существуют волокна из низкомолекулярных веществ (например, минеральные волокна) и существуют полимеры, практически неспособные формировать волокна (например, глобулярные белки). Тем не менее, способность полимеров к формированию волокон очень типична и одновременно важна с практической точки зрения: из полимерных волокон в значительной степени состоит живая материя, а также ткани, нетканые материалы и т.д.

Среди всего многообразия волокон особый интерес вызывают самые тонкие, субмикронные волокна. Их часто называют фибриллами, нанофибриллами, нанонитями или нановолокнами. Иногда считается, что термин «волокна» относится к более крупным структурам, а термин «фибриллы» к более мелким, например, мышечные волокна состоят из миофибрилл. Однако, если обсуждаемые объекты не обладают сложной иерархической структурой, как например, многие амилоидные фибриллы [2], то перечисленные термины часто бывают взаимозаменяемы. Выбор термина, который используется для обозначения тонких волокон, иногда связан со способом их получения. Например, об экструдированных волокнах и нитях говорят гораздо чаще, чем об экструдированных фибриллах.

Подходы к формированию тонких волокон крайне сложно поддаются классификации или систематизации. Можно условно разделить их на те, которые используют пропускание раствора или расплава через фильеру (spinning) и все остальные, лишенные такого технологического шага [3]. Это разделение подчеркивает возможную роль фильеры как фактора, ограничивающего диаметр, в изготовлении волокон. Такая классификация удобна,

потому что именно фильера является ключевым элементом множества технологических процессов, и представляется разумным выделить в одну группу те процессы, которые ее используют. В то же время легко найти пример подхода, который не вписывается в эту классификацию. Электроспиннинг (электроформование), изготовление тонких волокон в сильном электрическом поле, может быть реализовано как с использованием фильеры, так и без нее [4], и поэтому этот подход попадает в обе указанные группы одновременно. В нанотехнологии иногда разделяют технологии изготовления наноматериалов на группы «снизу вверх» и «сверху вниз», однако для нановолокон такое разделение не очень популярно [3].

В данном обзоре рассмотрены следующие подходы к изготовлению тонких волокон: вытяжка, экструзия, электроформование (электроспиннинг), самоорганизация (самосборка) и другие специализированные методы. Обсудим каждый из этих подходов более детально.

#### **1.1.1. Механическая вытяжка**

Механическая вытяжка является наиболее общим и фундаментально наиболее значимым способом формирования волокон, поэтому начать следует именно с нее. При вытяжке полимерные молекулы выстраиваются вдоль оси растяжения, и соответствующую ориентацию обычно характеризуют распределением сегментов по углам  $D(\alpha)$  и средним значением  $\langle \cos^2 \alpha \rangle$ , где  $\alpha$  – угол между локальным направлением цепи и выбранным направлением [5]. Само по себе среднее значение  $\langle \cos^2 \alpha \rangle$  не очень удобно, потому что для полностью изотропного состояния оно равно  $1/3$ , и вместо него используют фактор ориентации Германа:

$$f_g = \langle P_2(\cos \alpha) \rangle = \frac{1}{2} (3 \langle \cos^2 \alpha \rangle - 1)$$

Он равен нулю при изотропном расположении полимерных цепей, единице при предельной ориентации молекул и  $-0.5$  при расположении сегментов поперек выбранной оси, от которой отсчитывают углы.

С точки зрения морфологии полимера и его надмолекулярной структуры, вытяжка часто приводит к формированию тонких волокон, в частности, субмикронных. Это особенно характерно для частично кристаллических полимеров [6-8], но аналогичные процессы могут идти и в аморфных полимерах [9], [10]. Ни для того, ни для другого класса полимеров не существует универсальной модели фибриллизации и ее универсальных

критериев – это связано с разнообразием химической структуры полимеров и вариантов их надмолекулярной организации, а также разными вариантами вытяжки (она сильно зависит от скорости деформации, температуры и типа среды, окружающей образец).

Часто бывает, что формирование пустот в полимере и его распад на тонкие фибриллы на макроскопическом уровне сопровождается побелением образца, т.к. субмикронные волокна интенсивно рассеивают свет. В связи с этим в англоязычной литературе часто пишут о побелении образцов (stress-induced whitening) [7], [8]. Побеление образцов часто указывает на их фибриллизацию, но в общем случае это два разных процесса, и их следует рассматривать независимо. Во-первых, некоторые полимеры сами по себе непрозрачны, и вызванное деформацией побеление в них не наблюдается в принципе. Во-вторых, в некоторых образцах наблюдается побеление без фибриллизации [10-12].

Хотя фибриллизация может происходить при растяжении как аморфных, так и частично кристаллических полимеров, в данном рассмотрении мы сделаем больший акцент на последних, т.к. именно они рассмотрены в экспериментальной части работы. При неупругом растяжении частично кристаллических полимеров происходит серия структурных перестроек, связанных с укладкой молекул в ламели. Обычно при малом напряжении ламели вначале деформируются и разворачиваются, а затем при большем напряжении фрагментируются – это было показано как дифракционными методами [13-15], так и прямыми микроскопическими наблюдениями [13], [16-18]. Частично кристаллические полимеры обычно имеют либо сферолитную структуру, либо ламеллярную. Происходящие при растяжении процессы существенно зависят от взаимного расположения ламелей, а также от угла между плоскостью ламели и направлением растяжения.

Общее рассмотрение моделей пластической деформации частично кристаллических полимеров приведено в обзоре [8]. Выделяют четыре основные модели: модель кристаллографического скольжения, модель плавления-рекристаллизации, модель микрошейки и модель взаимопроникающих сетей. Модель кристаллографического скольжения предполагает, что сегменты молекул, формирующих ламель, смещаются друг относительно друга. Это может происходить либо вдоль оси  $c$ , либо в плоскости ламели, кроме того, может происходить проскальзывание ламелей друг относительно друга. В этих моделях акцент делается на изменениях структуры кристаллической фазы, и в них большое значение уделяется ее дефектам. Модель плавления-рекристаллизации предполагает, что

при достижении определенного напряжения происходит локальное плавление отдельных участков ламелей, при котором пропадает характерная для кристалла упорядоченность фрагментов цепей и возрастает их подвижность. Затем происходит рекристаллизация цепей в новом, более вытянутом состоянии, которое ближе к предельно ориентированному. В этой модели важен термодинамический аспект и зависимость температуры плавления полимера от напряжения. Модель микрошейки рассматривает формирование тонкой фибриллы как формирование шейки, происходящее на микроуровне [6]. В каждой такой шейке ламели фрагментируются, а возникающие фрагменты поворачиваются и выстраиваются вдоль направления вытяжки. Эта модель не применяется для описания сжатия полимеров. Наконец, модель взаимно проникающих сетей описывает частично кристаллический полимер как систему, состоящую из двух взаимосвязанных сетей – кристаллической (ламеллярной) и аморфной. Каждая макромолекула может принадлежать обоим сетям одновременно: отдельные участки цепи участвуют в построении кристаллитов, тогда как другие находятся в аморфной матрице и соединяют ламели между собой. По мере вытяжки ориентация цепей может возрастать за счёт выстраивания аморфных сегментов вдоль оси деформации, а также отрыва фрагментов от ламелей и последующей рекристаллизации в более упорядоченное состояние.

Среди полимеров выделяют группу жестко-эластичных (hard elastic), которые характеризуются высоким модулем Юнга (порядка 10 МПа и более) и способностью к большому растяжению (приблизительно на ~100% [19], [20]). Кроме способности к значительной деформации, их также отличает способность восстанавливать свои размеры после растяжения, напоминая свойства эластомеров. При этом большинство жестко-эластичных полимеров относятся к классу частично кристаллических. Например, при правильном выборе условий приготовления (прежде всего, экструзии и кристаллизации) высокую жесткость и эластичность могут сочетать ПЭВП, ПП, полиамиды, и другие широко распространенные полимеры.

Молекулярные механизмы, обеспечивающие жестко-эластичным полимерам их свойства, долгое время были предметом споров и активного исследования [21], [22], и оказалось, что фибриллизация полимера при вытяжке является одним из факторов, которые обеспечивают сочетание упругости и способности к обратимой деформации (рисунок 1 А,Б). Одна из качественных моделей, предложенная для волокон ПВДФ, представлена на

рисунке 1 В. Она объясняет два излома, которые наблюдались на деформационной кривой. Первый излом при ~5% соответствовал переходу от поворота и деформации ламелей к формированию пустот. В диапазоне от 5% до 40-50% деформация реализуется путем фибриллизации аморфной компоненты, и она обратима. Пластическая деформация (разрушение ламелей) нарастает постепенно, и становится наиболее важной при достижении второго излома (40-50%).

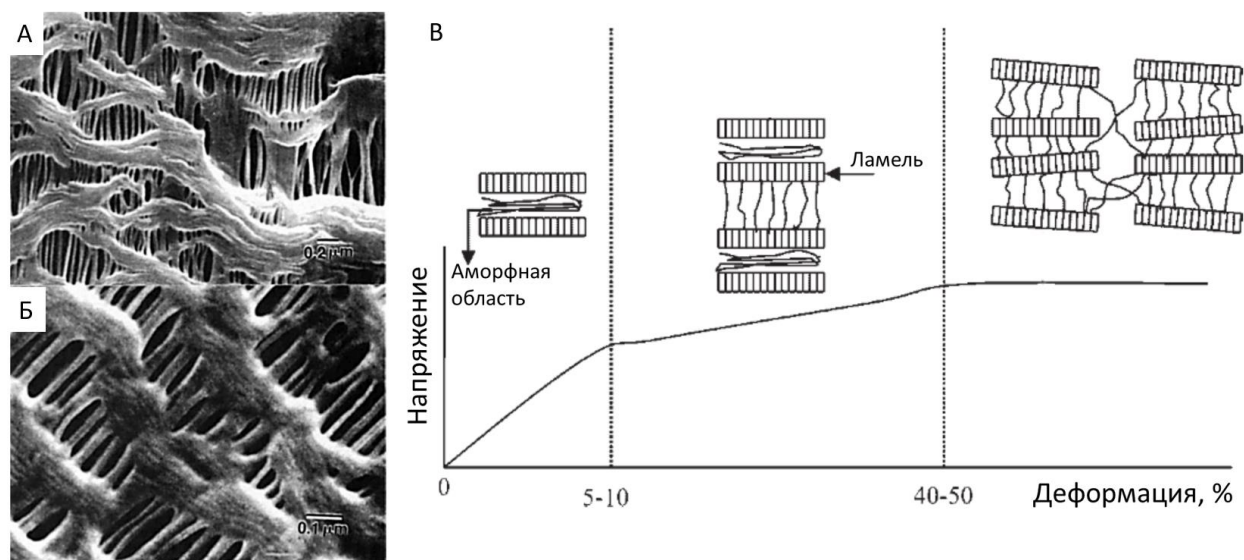


Рисунок 1 – Структура и механические особенности пленок из жестко-эластичных полимеров. СЭМ-изображения мембран из растянутого ПЭ (А) и ПП (Б) [23]. В – модель деформации волокон из ПВДФ [22]

С точки зрения структуры, растянутые жестко-эластичные полимеры содержат большое количество пор, разделенных тонкими фибриллами (нановолокнами). Их можно использовать для получения пористых мембран, но для этого после растяжения нужно закрепить структуру, т.е. не дать полимеру усесть. Это может быть достигнуто путем отжига: при нагреве напряжения релаксируют (также может происходить рекристаллизация), и после охлаждения образца и удаления механической нагрузки фибриллярно-пористая структура не коллапсирует, а сохраняется. Наиболее известным примером изделия, изготавливаемого по описываемой технологии, является серия полиолефиновых мембран марки Celgard [21], [23-25].

Считается, что при растяжении жестко-эластичных полимеров фибриллы практически всегда состоят из аморфного полимера, хотя прямое доказательство этого дифракционными или термическими методами анализа затруднено [19]. При этом

возможна кристаллизация ориентированных фрагментов полимерных цепей, которые входят в состав нанофибрилл, особенно при отжиге [21].

Фибриллизацию аморфной компоненты можно рассматривать с помощью следующей модели [26], [27]. Пусть куб с объемом  $V_{cube}^0$  заполнен аморфными случайно уложенными цепями, и общее количество подвижных сегментов в рассматриваемом объеме равно  $N$  (рисунок 2). Перенос одного сегмента из куба в ориентированную фибриллу сопровождается изменением его энергии и энтропии на величины  $\Delta E$  и  $\Delta S$ , причем поперечные размеры куба остаются неизменными при вытяжке. Относительное удлинение образца  $\lambda_{def}$  составляет  $\lambda_{def} = (l_{strand} + l_{cube})/l_{cube}^0$ . Фибрилла характеризуется естественной степенью вытяжки  $\lambda_{fibril}$ , и эта величина не изменяется по мере деформации. В этой модели энергия и энтропия перехода куба из исходного состояния в деформированное вычисляются по формулам:

$$E^{CS} = N \cdot \Delta E \frac{(\lambda_{def} - 1)}{(\lambda_{fibril} - 1)}$$

$$S^{CS} = -N \cdot \Delta S \frac{(\lambda_{def} - 1)}{(\lambda_{fibril} - 1)}$$

Особенность этих соотношений состоит в том, что и энергия, и энтропия линейно изменяются по мере деформации. Используя эти выражения, можно вычислить напряжение ( $\gamma$  - поверхностная энергия фибриллы,  $A_{fibril}$  – площадь ее поперечного сечения):

$$\sigma \approx \left( \frac{TN}{V_{cube}^0} \Delta S + \frac{N}{V_{cube}^0} \Delta E + \frac{4\gamma}{V_{cube}^0} A_{fibril} \lambda_{fibril}^{3/2} \right) \frac{1}{\lambda_{fibril} - 1}$$

Это выражение не зависит от удлинения образца  $\lambda_{def}$  и соответствует течению материала при постоянном напряжении. Хотя описанная модель и некоторые выражения, полученные на ее основе, помогли объяснить экспериментально измеренные закономерности деформации полипропилена [26], она имеет очень ограниченную применимость. В нее может быть добавлена усадка растягиваемого куба в плоскости, перпендикулярной оси вытяжки (эффект Пуассона) [28], но и в расширенном варианте она не получила широкого распространения.

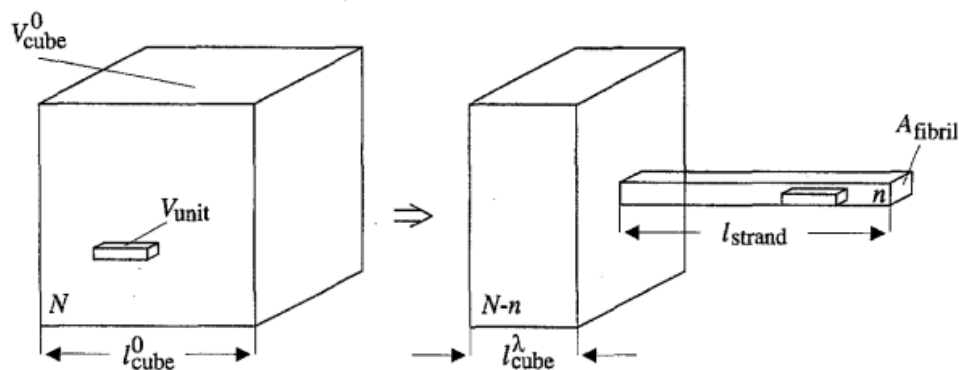


Рисунок 2 – Иллюстрация модели перехода полимера из конформации клубка в состояние фибриллы [26]

Для дальнейшего обсуждения уместно ввести понятие крейзинга (рисунок 3) [10], [19]. Крейзинг – это процесс пластической деформации, при котором в полимере возникают многочисленные микротрещины, заполненные тонкими фибриллами. Указанные микротрещины (крейзы) ориентированы перпендикулярно оси вытяжки, а фибриллы – вдоль нее, и они соединяют края крейза. С помощью крейзинга получены тонкие волокна ПЭВП, ПП и ПКЛ, описанные в разделе 2.4.

Крейзинг наблюдается как в аморфных, так и в частично кристаллических полимерах, и его развитие сильно зависит от условий, в которых происходит деформация. Он сопровождается увеличением поверхности полимера и, соответственно, поверхностной энергии. В связи с этим крейзинг часто наблюдается при растяжении образцов в среде, которая снижает их поверхностную энергию, такие среды называют физически активными или адсорбционно активными средами (ААС). Такой средой может быть органический растворитель [10], [29], [30] или, например, сверхкритический диоксид углерода [31].

Выделяют классический и делокализованный крейзинг [10], [19]. Они различаются тем, возникают ли крейзы в отдельных областях растягиваемого образца или по всему его объему. В некоторых случаях, в зависимости от надмолекулярной структуры полимера и среды, в которой происходит деформация образца, один и тот же полимер может деформироваться как по механизму классического, так и по механизму делокализованного крейзинга. Это было показано на примере ПП: в одной и той же ААС сферолитный ПП деформировался по механизму классического крейзинга, а ламеллярный – по механизму делокализованного крейзинга [A8].

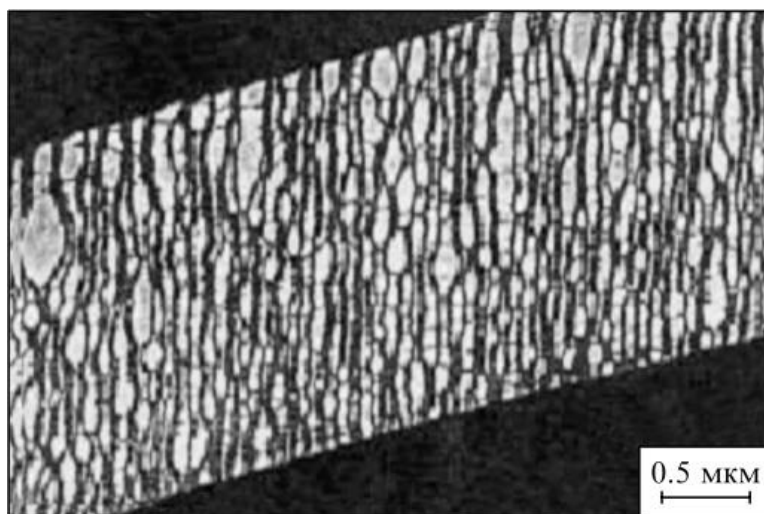


Рисунок 3 – Изображение крейза в пленке полистирола, полученное методом ПЭМ. Ось вытяжки вертикальная, видны многочисленные тонкие фибриллы [32].

Для крейзованных полимеров была установлена взаимосвязь

$$\sigma d \sim \Gamma \sqrt{V_f},$$

где  $\sigma$  – напряжение,  $d$  – диаметр фибриллы,  $V_f$  – объемная доля фибрилл в крейзе, а  $\Gamma$  – поверхностная энергия полимера [10]. Это соотношение подчеркивает роль поверхностной энергии: чем она больше, тем менее выгодно полимеру формировать развитую поверхность при деформации. Для крейзованных полимеров была обнаружена релаксация напряжений после их переноса из одно ААС в другую [19] – это явление объясняется влиянием поверхностной энергии полимера на его структуру и на процесс деформации.

У жестко-эластичных полимеров и у частично кристаллических полимеров, которые растягиваются по механизму делокализованного крейзинга, много общих черт. При одноосном растяжении они приобретают сходную морфологию: распадаются на множество кристаллических ламелей (или их фрагментов), соединенных тонкими фибриллами. Сходство усиливается тем, что некоторые полимеры, которые могут проявлять жестко-эластичные свойства, способны к крейзингу (например, ПП и ПЭВП). В некоторых работах мембраны Celgard описывают в терминологии крейзов [25] – и в этом случае граница между делокализованным крейзингом и фибриллообразованием, которое сопровождает растяжение жестко-эластичных полимеров, стирается.

Приведем некоторые специфические сведения о крейзинге ПЭВП, т.к. он является одним из основных полимеров, исследованных в данной работе (раздел 2.4). В данной работе был в основном использован ПЭВП, полученный методом экструзии с раздувом, и

у такой пленки есть явная анизотропия (выделяют направление оси экструзии и перпендикулярное ему). Этот образец способен к деформации по механизму крейзинга, это проиллюстрировано на рисунке 4.

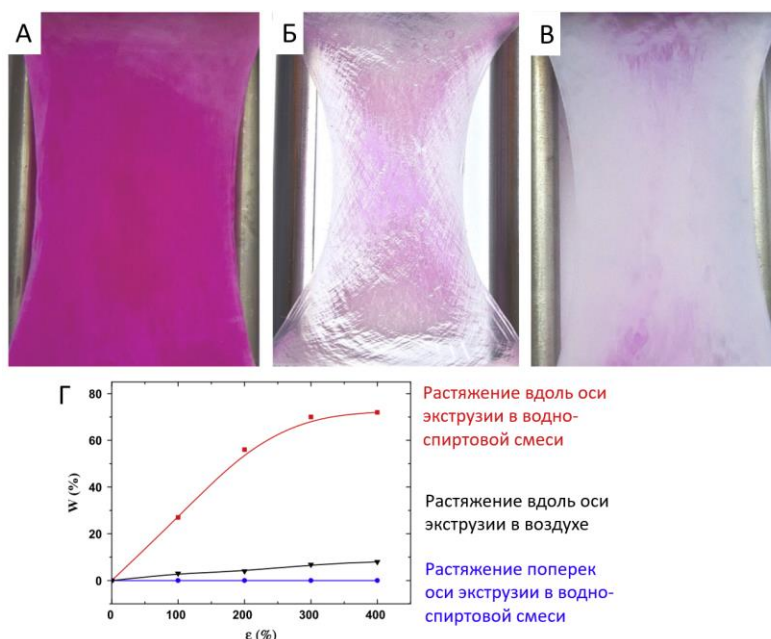


Рисунок 4 – Макроскопические особенности деформации ламеллярного ПЭВП [А6]. А – результат деформации в водно-спиртовой смеси вдоль оси экструзии пленки. Б – результат деформации на воздухе вдоль оси экструзии пленки. В – результат деформации в водно-спиртовой смеси поперек направления экструзии пленки. Г – зависимость относительного изменения объема пленки от степени деформации.

Чтобы проиллюстрировать возрастание пористости, которое происходит при крейзинге, растянутые образцы погружали в краситель (родамин), а затем промывали их водой. Образцы, которые были растянуты вдоль оси экструзии в водно-спиртовой среде, прокрашивались интенсивно (рисунок 4 А). Окрашивание оказывалось слабым, если деформация происходила вдоль оси экструзии на воздухе или в водно-спиртовой смеси, но поперек оси экструзии (рисунок 4 Б, В). Интенсивное проникновение красителя в полимерную пленку становится возможным, если в пленке развивается пористость. Это может быть подтверждено количественно, по изменению объема в зависимости от степени вытяжки (рисунок 4 Г). При растяжении пленки по механизму крейзинга ее объем увеличивался, а при отсутствии крейзинга деформация происходила при почти постоянном объеме. В разделе 2.4 с помощью микроскопии будет показано, что вытяжка ПЭВП в водно-спиртовой смеси сопровождается фибриллизацией полимера.

Механическая вытяжка, с одной стороны, помогает создавать полимерные волокна, а с другой стороны помогает снижать их диаметр (прежде всего, за счет эффекта Пуассона). В некоторых случаях субмикронные волокна могут быть получены путем вытяжки полимера без использования специфического оборудования. Например, достаточно растянуть каплю раствора ПП в циклогексане между большим и указательным пальцем – и при этом формируются волокна со средним диаметром  $\sim 420$  нм [33]. Для получения таких волокон в большем количестве можно использовать губку с раствором и расположенную напротив нее подвижную принимающую пластину.

Также простые, но показательные эксперименты были описаны для ПЭО: в водный раствор ПЭО погружали иглу, а затем вытягивали ее с постоянной скоростью, чтобы за ней потянулось субмикронное волокно [34]. Его диаметр определялся концентрацией и вязкостью раствора, скоростью испарения растворителя, а также геометрией системы – диаметром иглы, скоростью ее отведения и максимальным расстоянием, на которое она отводилась. Идея описываемых экспериментов состоит в том, чтобы сформировать волокно из вязкоупругого раствора путем его вытяжки. Задача масштабирования подобных систем привела к необычным технологическим решениям. Например, вращающаяся щетка от бытового фена может быть использована для формирования тонких волокон [35]. Для этого раствор, из которого изготавливают волокна, помещают на твердую поверхность, а над ней располагают вращающуюся щетку: ее ворсинки подхватывают раствор, и после испарения растворителя могут формироваться субмикронные волокна (рисунок 5).

В целом, роль механической вытяжки полимера в формировании волокон сложно переоценить. Ниже будет показано, что в ходе электроспиннинга (центрального способа формирования субмикронных волокон, используемого в данной работе) также большое значение имеет вытяжка. Механическая вытяжка может быть реализована как для вязких растворов, так и для твердых полимеров; для ряда твердых полимеров можно добиться формирования тонких волокон, если проводить растяжение не на воздухе, а в ААС.

В текстильной промышленности вытяжка используется в тесной связке с экструзией, и именно она будет рассмотрена ниже.

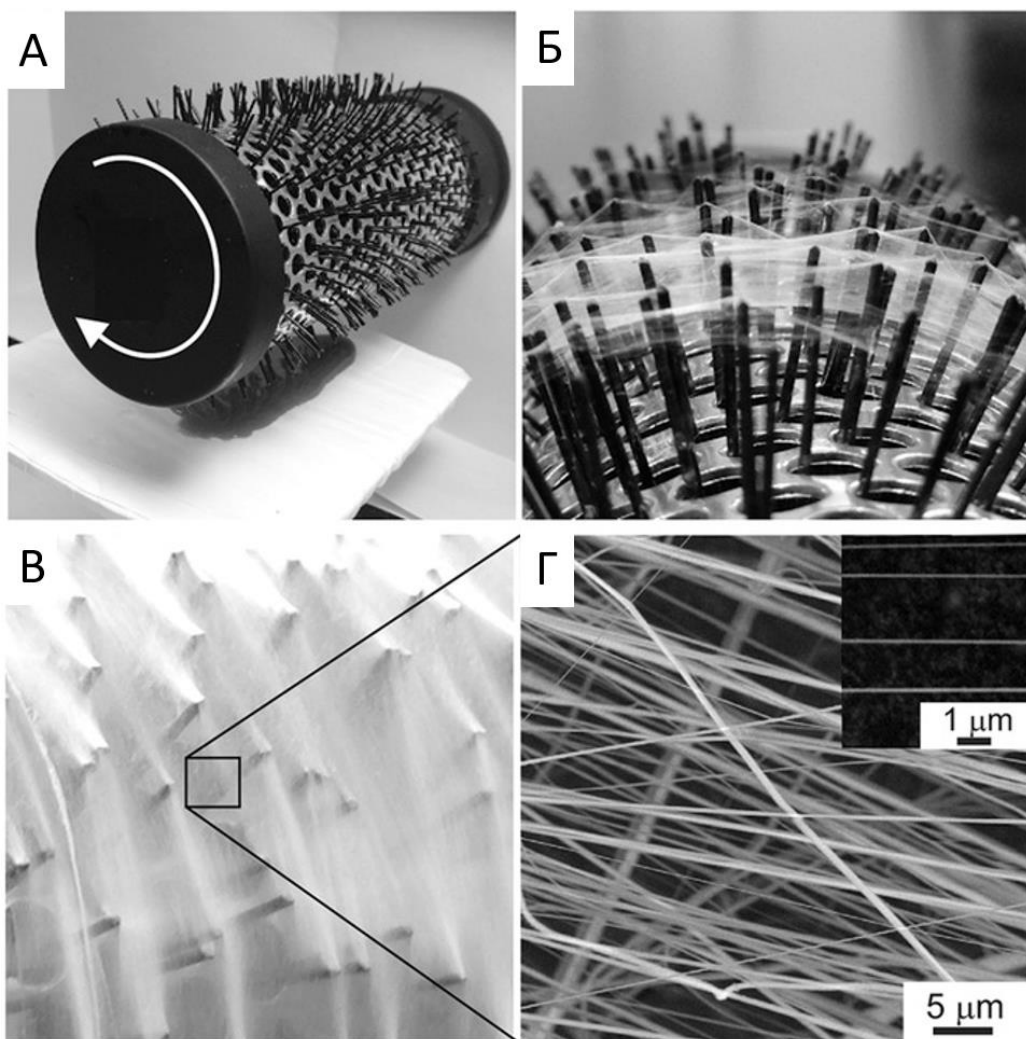


Рисунок 5 – Получение волокон ПЭО с помощью вращающейся щетки [35]. А – щетка над раствором ПЭО, в раствор для наглядности добавлен краситель, Б,В – фотографии волокон на ворсинках щетки, полученных за 1 и 5 минут, Г – СЭМ-изображения волокон.

### 1.1.2. Экструзия

С точки зрения текстильной промышленности, изготовление волокон путем экструзии является важнейшим и практически незаменимым процессом. Хотя экструдированные волокна не являются объектом данного исследования, экструзия как широко распространенный метод заслуживает рассмотрения в обзоре подходов к формированию волокон. Среди всего многообразия промышленно производимых волокон, 57–59 % приходится на экструдированные полиэфиры, прежде всего, ПЭТФ (по данным на 2023-2024 год [36]).

Экструдер – это прибор, который пропускает расплав или раствор полимера через фильеру, чтобы после пропускания он застыл и сформировал пруток, рукав или нить [37].

Экструзию расплавов применяют для полимеров, для которых температура плавления  $T_m$  ниже, чем температура термического разложения  $T_d$ . К ним относятся ПЭТ и другие полиэфиры, а также полиолефины и полиамиды. Для полимеров, которые при интенсивном нагреве начинают разлагаться, окисляться или претерпевать другие изменения химической структуры, используют экструзию вязких растворов. В этом случае после формирования волокна (или другого изделия, например пленки) удаляют остатки растворителя путем сушки. Такой подход используют для экструзии полиакрилонитрила (это предшественник углеродных волокон), ароматических полиамидов (арамидов), производных целлюлозы (например, вискозы), и других полимеров.

Экструдированное волокно часто обрабатывают потоком газа или жидкости. Обычно оно попадает на принимающие валики, которые обеспечивают его вытяжку, а для снижения температуры экструдированного материала он может быть погружен в охлаждающую ванну. После экструзии и вытяжки диаметр волокна оказывается меньше, чем диаметр фильеры, через которую пропускают расплав. Для непрерывности экструдированной нити должно выполняться уравнение непрерывности, которое при постоянной плотности записывается в виде [38]

$$\frac{\partial A}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial z}(Au_z) = 0$$

где  $A$  – площадь поперечного сечения струи,  $z$  – координата вдоль нее, а  $u_z$  – скорость расплава в направлении экструзии. В установившемся режиме получим  $\frac{\partial}{\partial z}(Au_z) = 0$ , т.е.  $Au_z = \text{const}$ . Коэффициент вытяжки  $DR$  вводится как соотношение площади струи на выходе из фильеры к площади сечения волокна ( $z=L$ ):

$$DR = \frac{A_0}{A} = \frac{D_0^2}{D^2} = \frac{u_z(z=0)}{u_z(z=L)}$$

Диаметр сопла обычно составляет  $D_\phi \sim 100$  мкм по порядку величины и при отсутствии отрыва струи от стенок сопла будет выполняться равенство  $D_0 = D_\phi$ , а коэффициент вытяжки  $DR$  непосредственно после экструзии обычно лежит в диапазоне 1-100. Последующая вытяжка дополнительно снижает диаметр, но в целом диаметр экструдированных (и впоследствии вытянутых) волокон обычно лежит в диапазоне 5-50 мкм и не достигает субмикронного диапазона (Таблица 1).

Таблица 1 – Данные о диаметрах экструдированных волокон из некоторых полимеров

| Полимер                      | Процесс            | Диаметр<br>фильеры, мм | Диаметр<br>волокна, мкм | Ссылка |
|------------------------------|--------------------|------------------------|-------------------------|--------|
| ПЛА                          | Экструзия расплава | 0.33                   | 18-22                   | [39]   |
| ПЛА                          | Экструзия расплава | 0.3                    | 4-10                    | [40]   |
| Смесь лигнина и ПВС          | Экструзия раствора | 0.159                  | 15-23                   | [41]   |
| терполимеры<br>на основе ПАН | Экструзия раствора | 0.5                    | 20-30                   | [42]   |
| Смесь ПЭТФ и ПП              | Экструзия расплава | Не указан              | 3-5.5                   | [43]   |
| ПП                           | Экструзия расплава | 0.4                    | 5-20                    | [44]   |
| ПП                           | Экструзия расплава | 0.5                    | 1.6                     | [45]   |

Для оценки диаметра экструдированных волокон иногда используют полуэмпирические модели [46], [47]. Одна из современных моделей предлагает оценивать диаметр волокон с помощью степенной функции от вязкости расплава  $\eta$ , диаметра фильеры  $D_\phi$ , давления охватывающего воздуха  $P$  и расхода  $Q$ :

$$D \sim \eta^\alpha D_\phi^\beta P^\gamma Q^\delta \sim \frac{\eta^{1/3} D_\phi^{1/4} Q^{1/2}}{P^{1/3}}$$

Коэффициент пропорциональности зависит от геометрии экструзионной системы, но показатели степени, входящие в эту формулу, применимы для разных по химической структуре и молекулярной массе полимеров. Применимость этой модели была показана для ПММА, ПС, ПП и ПЭТФ [46]. В то же время, ни эта модель, ни многие другие «технологические» полуэмпирические модели не позволяют определить нижний предел диапазона диаметров, достижимых с помощью экструзии [48].

Есть ряд технологических и фундаментальных причин, по которым экструзия не позволяет получать тонкие волокна. Один из факторов, ограничивающих этот подход, это неустойчивость струи, т.е. ее распад на капли. И для ньютоновских, и для неньютоновских жидкостей характерна неустойчивость Рэлея-Плато – явление распада струи жидкости на отдельные капли. В простейшем случае ее можно описать следующим образом [49-51]. Сравним поверхностную энергию боковой поверхности цилиндрической струи (радиус  $R_0$ , длина  $L$ ) и  $n$  сферических капель (радиус капли  $r$ ). Если энергия капель меньше, чем энергия

струи, то распад будет энергетически выгодным. Постоянство объемов приводит к соотношению

$$\pi R_0^2 L = \frac{4}{3} \pi r^3 n$$

Тогда соотношение суммарной площади поверхности капель и площади боковой поверхности струи равно

$$\frac{S_n}{S_0} = \frac{n \times 4\pi r^2}{2\pi R_0 L} = \frac{3R_0}{2r}$$

Для значений поверхностной энергии выполняется такое же соотношение. Итак, геометрическое рассмотрение подсказывает, что при  $r > 1.5R_0$  распад струи на капли может быть энергетически выгодным.

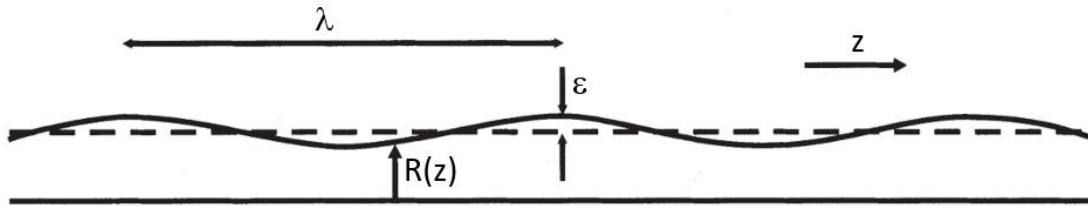


Рисунок 6 – Периодическое возмущение на поверхности струи жидкости [50].

Более строгое рассмотрение этого распада должно рассматривать малые возмущения поверхности струи. Допустим, на ней возникает волна, т.е. диаметр получает периодическую модуляцию с амплитудой  $\varepsilon$ , а радиус струи становится  $R = R_0^* + \varepsilon \cdot \cos(kz)$ . Чтобы сохранить объем жидкости, ее средний радиус должен уменьшиться с  $R_0$  до

$$R_0^* = \sqrt{R_0^2 - \frac{\varepsilon^2}{2}} \approx R_0 - \frac{\varepsilon^2}{4R_0}.$$

Поверхностная энергия недеформированной струи составляет  $E_0 = 2\pi\gamma R_0 L$  (длина  $L$ , поверхностное натяжение  $\gamma$ ), а поверхностная энергия деформированной струи может быть оценена как [51]

$$E_s = 2\pi\gamma \int R(z) \sqrt{1 + R'(z)^2} dz \approx 2\pi\gamma L \left( R_0 + \frac{\varepsilon^2}{4} \left( R_0 k^2 - \frac{1}{R_0} \right) \right)$$

Соответственно, относительное изменение энергии при деформации составит

$$\frac{E_s - E_0}{E_0} = \frac{\varepsilon^2}{4R_0^2} ((kR_0)^2 - 1)$$

При достаточно большой длине волны  $\lambda > 2\pi R_0$  малое возмущение может привести к неустойчивости и распаду струи на отдельные капли. Однако, чтобы определить, какое

именно возмущение будет нарастать, необходимо учитывать динамику поверхности. Соответствующее рассмотрение показывает, что по Рэлею наименее стабильное возмущение имеет длину волны  $\lambda_{crit} \approx 9R_0$  [51], [52]. Росту возмущения противостоит инерция материала, из которого состоит струя, а также вязкость жидкости.

Приведенное рассмотрение относится к осесимметричному возмущению жидкости. Если возмущение не является осесимметричным, и возникают отклонения струи от ее оси при постоянном диаметре, то стремление системы минимизировать поверхностную энергию является не драйвером распада, а наоборот, стабилизирующим фактором [53].

В приведенном рассмотрении не учитывается гравитационная сила, которая действует на струю. Для оценки применимости такого приближения используют число Бонда, т.е. отношение гравитационной и поверхностной энергии фрагмента струи:

$$Bo = \frac{gR_0^2\rho}{\gamma}$$

Пусть для расплава ПЭТ  $\gamma=30$  мН/м [54], плотность  $\rho=1.2$  г/см<sup>3</sup> [55]. Тогда для струи с диаметром  $R_0=0.5$  мм получим  $Bo=0.1$ , а для воды аналогичный расчет даст еще меньшее значение. Таким образом, для тонких струй пренебрежение влиянием гравитации оправдано. Анализ динамики струи с учетом и гравитационного вклада, и поверхностного натяжения, применимый в широком диапазоне скоростей, был получен относительно недавно [56].

Вернемся к обсуждению экструзии. Кроме распада струи на отдельные капли, при экструзии иногда наблюдается сходное явление, которое получило название «резонанс вытяжки». Он наблюдается только при наличии принимающих валиков, которые создают натяжение формируемого волокна [57], а эффект Рэлея-Плато более универсален и не требует натяжения. Оба эти фактора нарушают стабильность процесса экструзии и затрудняют получение тонких волокон.

Несмотря на указанные сложности, некоторые авторы указывают на возможность получения субмикронных волокон при экструзии, причем без использования стадии вытяжки на валиках. Например, из ПП могут быть изготовлены волокна со средним диаметром  $0.44 \pm 0.32$  мкм [58]. Диаметр фильеры составлял 0.5 мм, формирование тонкого волокна достигалось тщательным подбором скорости подачи расплава, а также подачей воды в качестве среды, охватывающей экструдированное волокно. Аналогично, были

получены волокна из ПП, ПС и ПБТ со средними диаметрами 0.3 мкм, 0.38 мкм и 0.44 мкм [48]. Снижение диаметра по сравнению с типичными значениями достигалось путем подбора скорости подачи воздуха, обдувающего струю, а также температуры расплава. Приведенные примеры являются исключениями из общей закономерности: экструдированные волокна обычно сравнительно крупные, и поэтому экструзию редко рассматривают как технологию получения субмикронных волокон. Идея пропускания раствора или расплава через отверстие для формирования волокна используется в электроформовании – этот метод будет рассмотрен в следующем разделе.

### 1.1.3. Электроформование

Метод электроформования (электроспиннинга) был предложен в середине XX века академиком Петряновым-Соколовым [59], [60]. В настоящее время этот метод имеет колоссальную популярность, и многие авторы рассматривают его как основной способ получения нановолокон [3], [61], [62]. Его принцип проиллюстрирован на рисунке 7. Раствор полимера (обычно используют именно раствор и сравнительно редко – расплав) подают через иглу, напротив которой расположен проводящий коллектор, например пластина, вращающийся цилиндр или решетка. Между иглой и коллектором прикладывают постоянное напряжение порядка  $\sim 10\text{--}50$  кВ. В электрическом поле струя полимера движется по направлению к коллектору, и при этом она подвергается интенсивному растяжению за счет отталкивания одноименных зарядов, находящихся на ней. Это растяжение, а также испарение растворителя приводят к снижению ее диаметра, и в результате волокно, которое осаждается на коллектор, имеет диаметр на 2-3 порядка меньше, чем отверстие на конце иглы, через которое подается раствор.

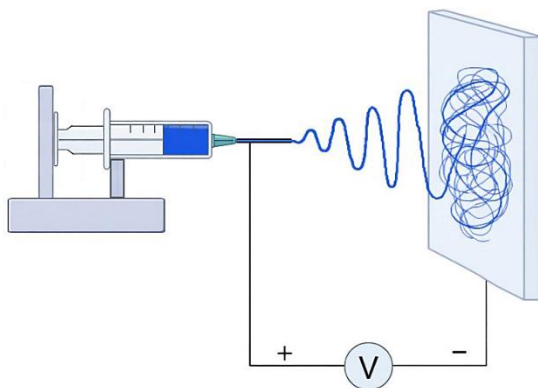


Рисунок 7 – Схема электроспиннинга: раствор полимера подается через иглу, расположенную напротив коллектора, причем между иглой и коллектором приложено напряжение.

Техническая реализация метода электроформования имеет огромное количество вариантов. Вдоль или поперек оси иглы может быть направлен поток воздуха или паровоздушной смеси. Обычно он способствует более быстрому высыханию растворителя, но иногда выполняет и другую функцию. Например, иногда иглу обдувают парами растворителя, чтобы предотвратить высыхание раствора на ее кончике [60]. Подача раствора может осуществляться через одну иглу или через множество игл, причем они могут быть расположены в виде решетки (для высокопроизводительного электроформования, рисунок 8 А) или вложены одна в другую (для коаксиального электроформования). В некоторых установках предусмотрена подача раствора в чашу, имеющую острые края (вблизи них напряженность электрического поля максимальна), над которой расположен коллектор (рисунок 8 Б). При этом струи полимерного раствора формируются на краях чаши – и движутся вверх к коллектору. В качестве коллектора может выступать вращающийся элемент: диск, цилиндр или спираль (рисунок 8 В-Д). Этот элемент погружен в ванну с раствором: в нижней точке он подхватывает раствор, а в верхней отдает этот раствор в струи. Эти системы отдаленно напоминают описанный выше способ получения волокон с помощью вращающейся щетки (рисунок 5).

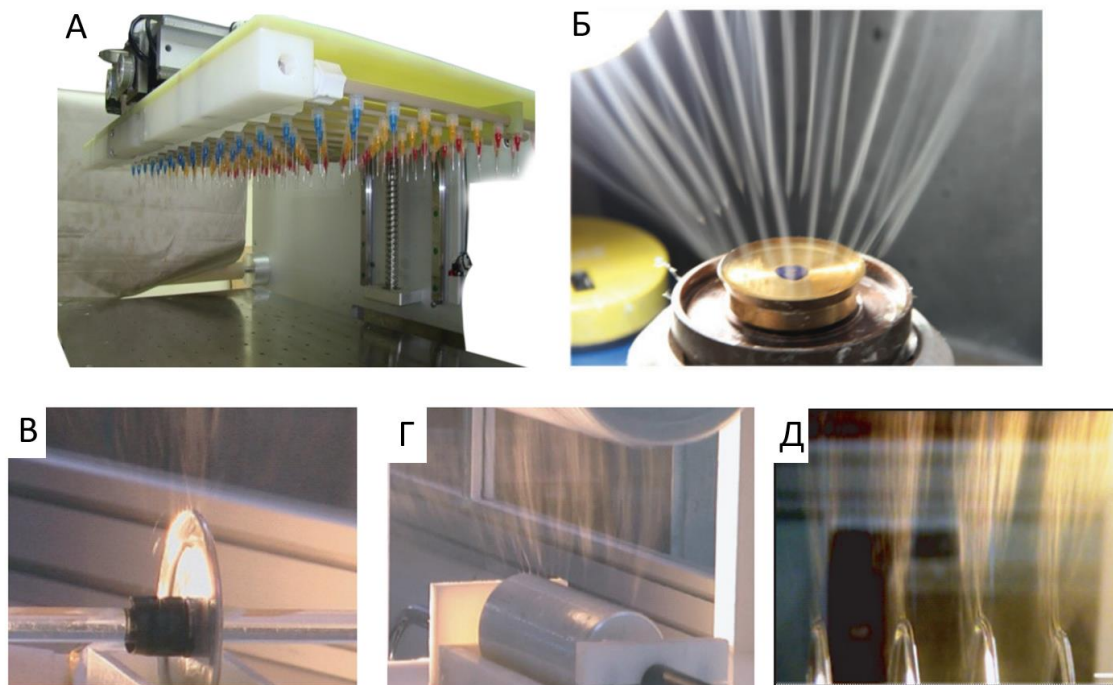


Рисунок 8 – Разные способы подачи раствора при электроформовании: множество игл (А), чаша с острыми краями (Б), вращающийся диск (В), вращающийся цилиндр (Г), вращающаяся спираль (Д) [4], [63].

Электроформованные волокна собираются на коллекторе – и складываются в нетканый материал, мембрану. Такие мембраны были исходно разработаны для использования в качестве воздушных фильтров [59], [60]. Они эффективно улавливают аэрозольные частицы при низком сопротивлении потоку воздуха, что очень важно для дыхания. Электростатический заряд, который сохраняется на волокнах в течение длительного времени, улучшает фильтрационные свойства. Со временем спектр применений электроформованных мембран расширился: их стали использовать не только в индивидуальных средствах защиты, но и в других фильтрах, например, вентиляционных и аналитических. Затем в начале XXI века этот метод пережил «второе рождение» и начал стремительно набирать популярность не только в России, но и в мире, как инструмент для изготовления тонких волокон, имитирующих структуру внеклеточного матрикса.

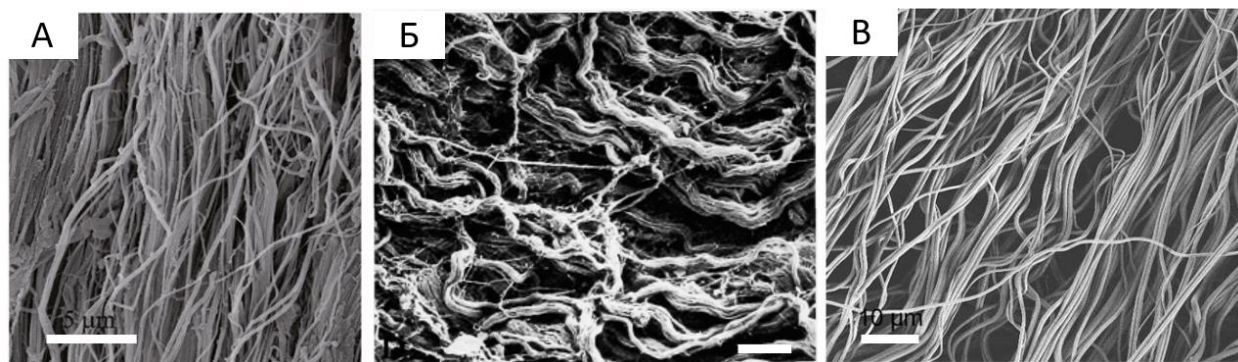


Рисунок 9 – Иллюстрация сходства между внеклеточным матриксом мягких тканей и электроформованной мембраной. А – децеллюляризованный мениск коленного сустава свиньи (масштабная метка 5 мкм) [64], Б – децеллюляризованный подслизистый слой кишечника свиньи (масштабная метка 10 мкм) [65], В – электроформованная мембрана из ПЛА (масштабная метка 10 мкм).

На рисунке 9 А, Б представлены изображения децеллюляризованной ткани, т.е. животной ткани, из которой путем химической обработки были удалены клетки. С точки зрения химической структуры, внеклеточный матрикс состоит преимущественно из коллагена (на него приходится до 90% массы обезвоженного матрикса) и некоторых других белков (ламинина, фибронектина), а также глюкозаминогликанов (гиалуроновой кислоты, хондроитин сульфата и других) [66]. С точки зрения морфологии, он представляет собой множество субмикронных волокон, и эту структуру можно сравнительно легко симитировать с помощью электроформования (рисунок 9 В). Возможность использования электроформования для решения медицинских задач (создания раневых покрытий,

каркасов для тканеинженерных конструкций, имплантов) является важным драйвером интереса к этому методу.

При электроформовании обычно используют постоянное напряжение, а использование переменного описано в единичных работах [67], и его преимущества неочевидны. Полярность напряжения может быть разной, и на практике используют практически все возможные варианты: положительный или отрицательный электрод на игле при заземленном коллекторе, а также положительный или отрицательный электрод на игле и электрод противоположного знака на коллекторе [68], [69]. Ток  $I$  между иглой и коллектором может течь с помощью двух разных механизмов. Во-первых, он может обеспечиваться подвижными зарядами, которые перемещаются в струе за счет ее проводимости. Во-вторых, он может обеспечиваться адвекцией зарядов, т.е. их перемещением за счет движения струи. В этом случае ток можно представить как сумму [70], [71]:

$$I = 2\pi\sigma_0 h v + \pi E K h^2$$

В этой формуле  $h$  – это диаметр струи (предполагается, что она имеет цилиндрическую форму),  $v$  – ее скорость,  $\sigma_0$  – поверхностный заряд,  $E$  – напряженность электрического поля, а  $K$  – удельная проводимость. На практике обычно адвекция дает более значительный вклад в ток, чем проводимость струи, и вторым слагаемым в этой сумме пренебрегают. При лабораторном электроформовании по порядку величины сила тока обычно составляет  $I \sim 10$ - $100$  нА и изредка достигает  $I \sim 1$  мкА [72], [73].

Процесс электроформования можно описать с точки зрения электромеханических неустойчивостей. Можно выделить следующий список неустойчивостей (нестабильностей), которые проявляются в экспериментах:

1. Неустойчивость заряженной капли и формирование конуса Тейлора
2. Неустойчивость заряженной струи и ее распад на капли (переход в электроспрей)
3. Одна или несколько изгибных неустойчивостей заряженной струи
4. Неустойчивость заряженной струи и ее фрагментация на дочерние струи
5. Неустойчивость оболочки на поверхности струи [74]

Если поместить каплю жидкости на конце капилляра с радиусом  $R_{\text{cap}}$  в электрическое поле, то жидкость поляризуется и приобретает форму конуса (более строго - параболоида),

который называют конусом Тейлора. При достижении критического напряжения  $U_{critT}$  сила электростатического притяжения зарядов, находящихся на капле, к противоэлектроду, оказывается настолько большой, что сила поверхностного натяжения перестает поддерживать ее целостность, и жидкость устремляется к противоэлектроду – либо в виде капель, либо в виде струи [75]. Это явление было впервые описано в классической работе Тейлора [76]. Одно из эмпирических соотношений для оценки критического напряжения записывается в виде [77]

$$U_{critT} = 300 \sqrt{20\pi\gamma R_{cap}}$$

В этой формуле  $U_{critT}$  измеряется в вольтах, поверхностное натяжение  $\gamma$  – в дин/см, а радиус капли  $R_{cap}$  – в см. Соответственно, для типичной системы при  $R_{cap} \sim 0.1$  см получаем  $U_{critT} \sim 5$  кВ. Эта оценка отлично соответствует экспериментам: обычно электроспиннинг проводят при более высоком напряжении.

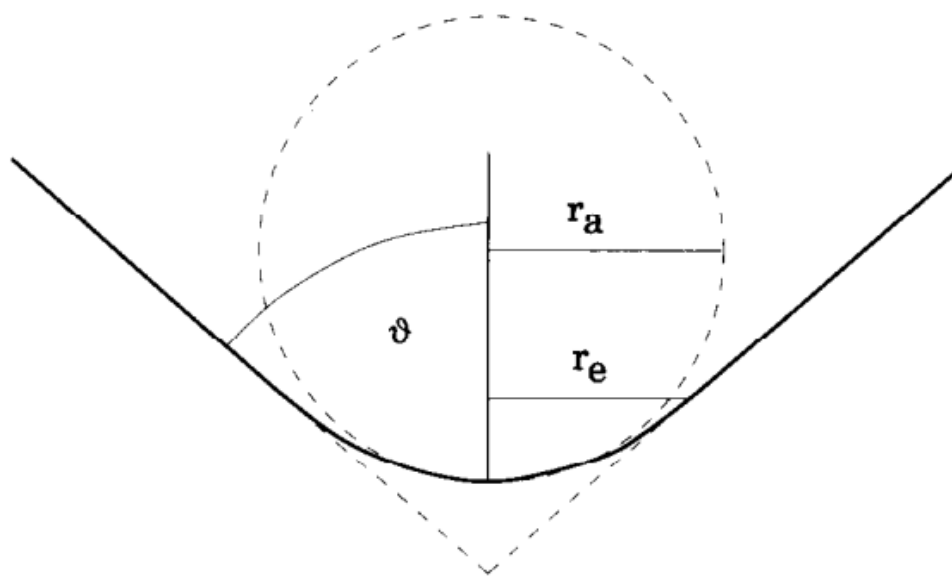


Рисунок 10 – Геометрическая модель конца Тейлора. На конце конус сглаживается до радиуса кривизны  $r_a$ , угол при вершине конуса  $\vartheta$ , струя формируется на площадке радиуса  $r_e$  [75].

Диаметр площадки, от которого берет свое начало струя раствора, заметно меньше диаметра иглы. Для оценки размера этой площадки были предложены несколько моделей. Например, этот радиус можно оценить с помощью соотношения [75]

$$r_e \approx \sqrt[3]{\frac{\rho Q^2}{4\pi^2 \gamma \cdot \operatorname{ctg} \vartheta \cdot \left(\left(\frac{U_a}{U_{critT}}\right)^2 - 1\right)}}$$

В этой формуле  $\rho$  – плотность раствора,  $\vartheta$  – половина угла при вершине конуса (Рисунок 10),  $U_a$  – напряжение (предполагается  $U_a > U_{critT}$ ). Это соотношение получено исходя из баланса капиллярной силы и силы поверхностного натяжения. При типичных значениях параметров ( $\rho=1.3$  г/см<sup>3</sup>,  $Q=1$  мл/ч,  $\vartheta=50^\circ$ ,  $\gamma=30$  мН/м,  $U_a/U_{critT}=2$ ) получаем  $r_e=3.2$  мкм. В экспериментах обычно наблюдается  $r_e \sim 1-10$  мкм [51].

Струя заряженной жидкости, которая движется в постоянном электрическом поле, может распасться на отдельные капли вследствие упомянутой выше неустойчивости Рэлея-Плато, которая в общем случае может происходить на любой струе независимо от ее заряда. Обычно находящиеся на струе одноименные электрические заряды способствуют такому распаду, хотя при некоторых модах колебаний поверхности струи они могут стабилизировать ее целостность [53]. При недостаточной вязкости раствора (например, при недостаточной концентрации или низкой молекулярной массе полимера) цельность струи нарушается – и она превращается в отдельные капли. В этом случае говорят, что система находится в режиме электроспрея, а не электроспиннинга (электроформования); на коллекторе формируется островковое или сплошное покрытие, а не волокнистая структура. Обычно при электроспиннинге экспериментаторы стараются не допустить того, чтобы струя распадалась на капли, если только их получение не является целью эксперимента [78].

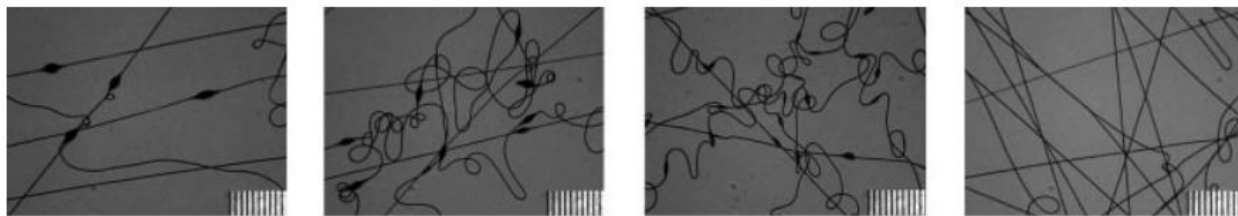


Рисунок 11 – Изображения волокон и "бусин на нити" из ПОБВ, сформированных методом электроформования при разном напряжении (10, 20, 26 и 30 кВ) [79]. На масштабном маркере каждая отметка соответствует 10 мкм.

В качестве промежуточного варианта между каплями и цилиндрическими волокнами часто наблюдаются промежуточные структуры, которые называют «бусины на нити» [79-81] (Рисунок 11). Количественное объяснение перехода от капель к бусинам на нити и к волокнам, которое происходит по мере увеличения концентрации, дано в работах [82-84].

При концентрации раствора ниже концентрации перекрывания клубков  $c^*$  система находится в режиме электроспрея, и волокна не формируются. При достижении  $c^*$  и переходе в режим полуразбавленного раствора, вязкость обычно все еще недостаточна для формирования волокон, и необходимо дальнейшее повышение концентрации. При достижении концентрации зацепления  $c_e$  количество топологических петель становится настолько значительным, что динамика цепи изменяется, и внутри каждого полимерного клубка возникают фрагменты цепи, ограниченные топологическими зацеплениями. Масса каждого такого фрагмента  $M_{e\text{ sol}} < M$ , и можно оценить количество зацеплений с помощью соотношения

$$n_e = \frac{M}{M_{e\text{ sol}}}$$

Величина  $M_e$  обычно обратно пропорциональна объемной доле полимера, т.е.  $M_{e\text{ sol}} = M_e / \Phi$ , где  $M_e$  – молекулярная масса зацепления для расплава, а  $M_{e\text{ sol}}$  – для раствора. Пороговые концентрации перекрывания  $c^*$  и зацепления  $c_e$  могут быть измерены с помощью реологии и вискозиметрии [83], [84]. Величина  $M_e$  может быть оценена экспериментально, т.к. она связана с модулем накопления на плато (модулем упругости)  $G_0$  для расплава:

$$G_0 \approx \frac{\rho RT}{M_e}$$

Обычно волокна начинают формироваться при концентрации раствора, которая обеспечивает  $n_e \sim 2-3$ . Для множества экспериментальных систем было экспериментально показано, что минимальное значение  $n_e$ , при котором формируются сплошные волокна без бусин, составляет приблизительно  $\sim 3.5$  [82]. Это было справедливо как для полярных полимеров и растворителей (ПВП в этаноле, ПЭО в воде), так и для неполярных (ПС в ТГФ, ПЛА в хлороформе, дихлорметане и тетрагидрофуране).

Утолщения и бусины на волокнах также можно рассматривать в контексте электропроводности раствора [85]. В некоторых экспериментальных системах при недостаточной электропроводности раствора возникали «бусины на нити», но после добавления соли при тех же параметрах процесса формировались сравнительно монодисперсные цилиндрические волокна. При электроформовании используют как неорганические соли, так и органические. Зависимость дисперсии диаметра волокон от концентрации соли может иметь минимум. При малой проводимости раствора добавление

соли помогает устранить «бусины» и сделать волокна более однородными, но после некоторого порога дальнейший рост концентрации соли приводит к росту гетерогенности волокон (увеличению разброса диаметров).

Две указанные неустойчивости (неустойчивость капли в электрическом поле и распад струи на капли) кажутся не первостепенными, т.к. одна из них наблюдается в экспериментах всегда, а от другой экспериментаторы обычно стараются избавиться (обычно это достигается выбором концентрации раствора, в редких случаях – изменением проводимости). На этом фоне более интересна изгибная неустойчивость (рисунок 12).

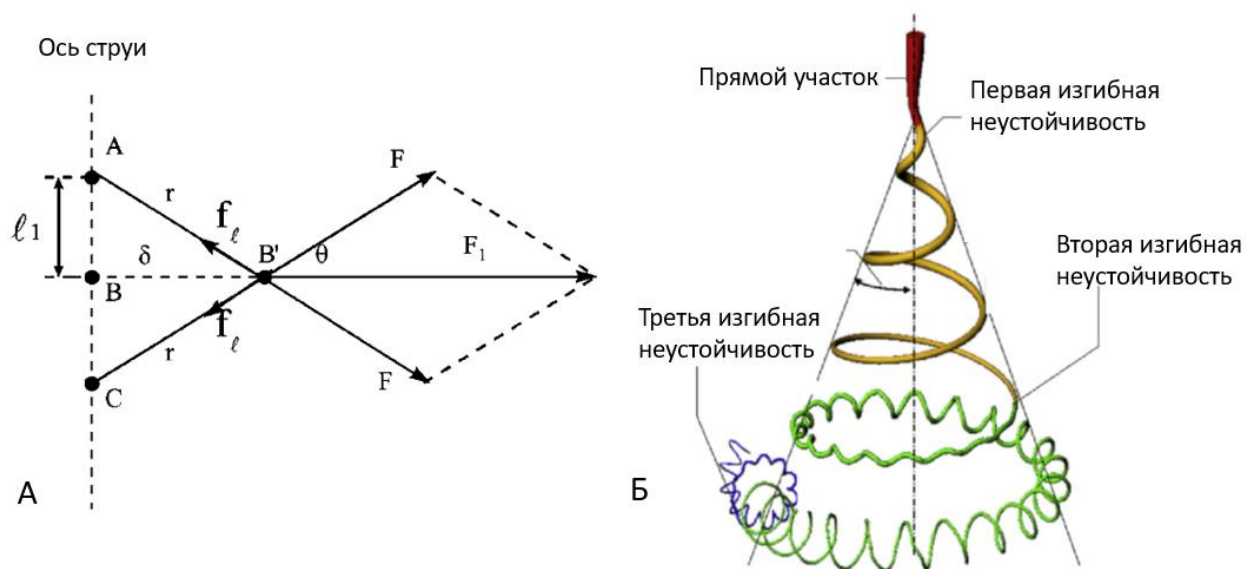


Рисунок 12 – Изгибная неустойчивость струи в электроформовании. А – силы, действующие на элемент струи, отклонившийся от оси [86]. Б – общая траектория струи при электроформовании [72].

Согласно теореме Ирншоу, система точечных зарядов не может находиться в устойчивом равновесии только под действием электростатических сил. Рассмотрим три точечных заряда  $q$ , расположенных на одной линии в точках А, В, С на прямолинейном участке струи (рисунок 12 А). Если один из этих зарядов сместился на расстояние  $\delta$  из В в В', то на него действует сила  $F_1 = 2F \cdot \cos\theta = (2q^2/r^3) \cdot \delta$ . Если масса заряда равна  $m$ , то уравнение его движения можно записать в виде

$$m \frac{d^2 \delta}{dt^2} = \frac{2q^2}{(\ell_1^2 + \delta^2)^{3/2}} \delta$$

Если пренебречь смещением  $\delta$  по сравнению с исходным расстоянием между зарядами  $l_1$ , то получим экспоненциально растущее решение  $\delta(t) = \delta_0 e^{\sqrt{2q^2/l_1^3}t}$ , и это иллюстрирует неустойчивость системы, в соответствии с теоремой Ирншоу. В реальной струе полимера электростатической силе противостоит механическое напряжение в струе, которое возникает за счет зацеплений молекул, а также сила поверхностного натяжения.

Если траектория струи отклоняется от оси, то отклоняющая ее электростатическая сила снижается, но при этом струя сжимается, т.к. ее длина увеличивается. В результате из прямого отрезка струи возникает петля, и этот переход называют изгибной неустойчивостью. На макроскопическом уровне он выглядит как расширение первичной струи, и его часто неверно интерпретируют как ее разветвление на множество дочерних струй. Однако съемка, выполненная высокоскоростной камерой, показывает, что это быстрое движение одной струи, отклонившейся от направления к коллектору, и это движение происходит в пределах конуса (рисунок 12 Б) [72].

Отклонение струи от прямой траектории и возникновение петель на ней сопровождается снижением ее диаметра. Это может стать причиной второй изгибной неустойчивости, которая приводит к возникновению вторичной спирали (траектория струи усложняется, диаметр снижается). В некоторых экспериментах этот процесс повторяется трижды, как показано на рисунке 12 Б. Изгибная неустойчивость струи приводит к характерной спиральной форме волокон, это проиллюстрировано на рисунке 13 на примере волокон из ПКЛ.

Изгибная неустойчивость резко (вплоть до 10000 раз [72]) увеличивает длину траектории струи, и следовательно снижает ее диаметр. Но в некоторых экспериментах проявляется и другой механизм снижения диаметра – ветвление струи [72], [87], [88]. Этот вид неустойчивости является следствием накопления зарядов на поверхности струи, и реализуется, когда силы когезии перестают удерживать вместе молекулы струи. Ветвление обычно происходит в местах интенсивного изгиба струи, и в результате ветвления формируются дочерние струи разных диаметров.

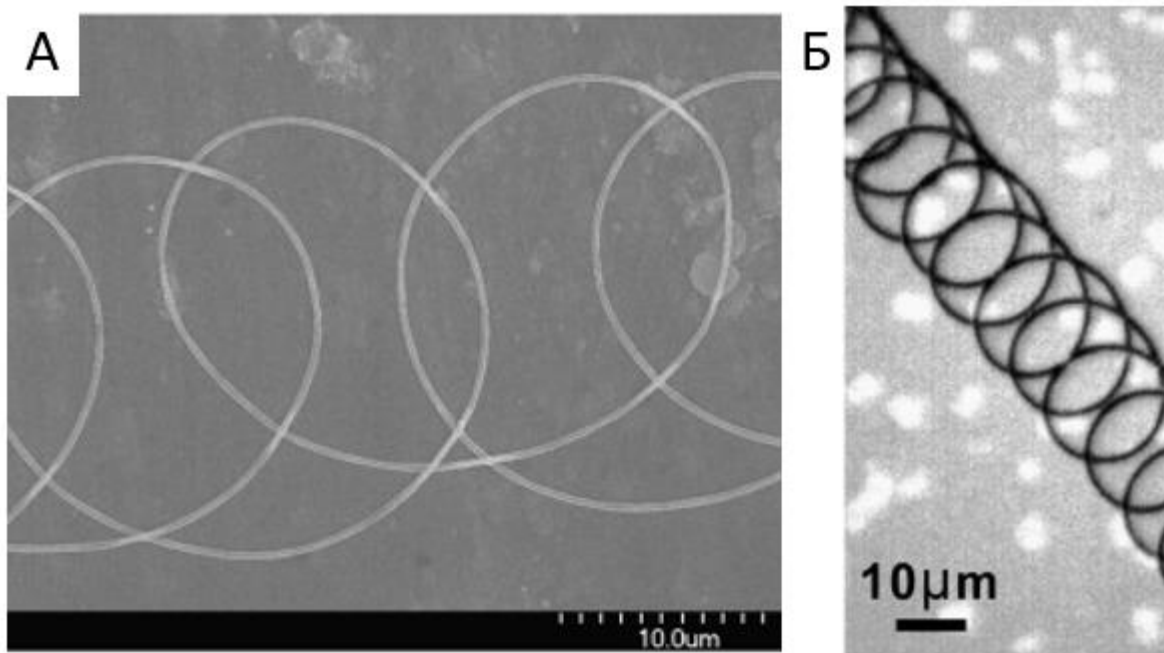


Рисунок 13 – Спиральные волокна из ПКЛ [89]. А - изображение, полученное методом СЭМ, Б - изображение, полученное с помощью оптической микроскопии.

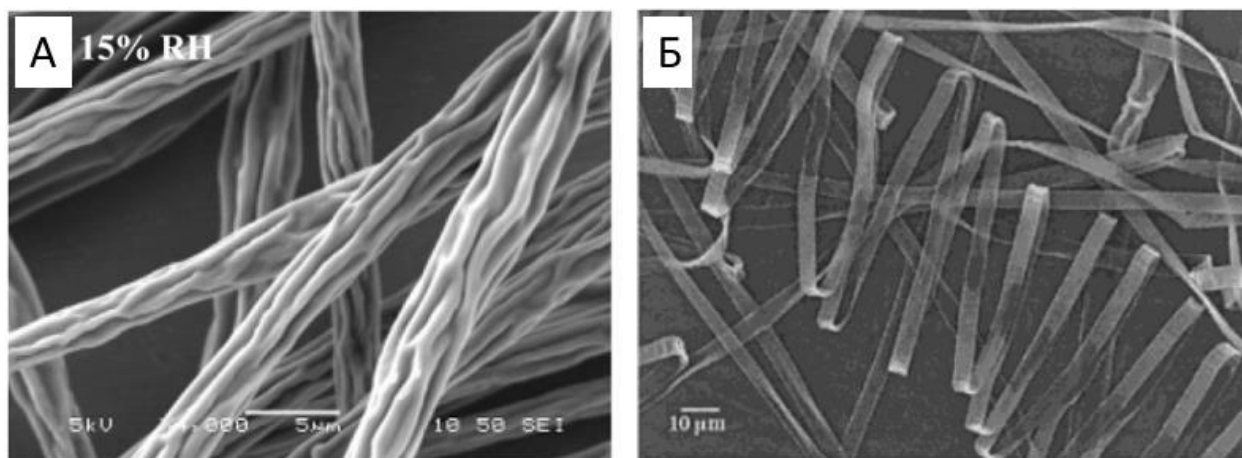


Рисунок 14 – Примеры морщинистых волокон и лент, полученных путем электроформования. А – морщинистые волокна из полистирола [90], Б – ленты из полиэфиримида [91].

Последняя неустойчивость, которая может проявляться при электроформовании, это потеря устойчивости оболочки струи. При ее движении к коллектору происходит испарение растворителя с поверхности, и в результате на поверхности струи формируется сравнительно твердая оболочка, в которой концентрация полимера выше средней. Существование такой оболочки подтверждено и расчетами, и экспериментальными

данными [74], [92]. Твердая оболочка, расположенная на мягком основании, подвергается сжимающему действию за счет силы поверхностного натяжения. Для такой системы возможна потеря устойчивости, характерная для систем типа «жесткое покрытие на податливом основании» [10]. Примером такой системы является кожа с признаками старения – на ней возникают морщины, т.к. сжимающее напряжение приводит к потере устойчивости, аналогично тому как при сжатии стержня с двух концов он в определенный момент изгибается и принимает форму дуги. В экспериментах по электроспиннингу это приводит к формированию морщинистых волокон, а также лент (рисунок 14 А и Б, соответственно).

Наиболее полное теоретическое объяснение этих явлений приведено в работе [74]. Пусть струя состоит из «сердечника», с радиусом  $a$ , модулем Юнга  $E_c$  и коэффициентом Пуассона  $\nu_c$ , а на ней расположена оболочка с толщиной  $t$  и механическими параметрами  $E_s \gg E_c$  и  $\nu_s$ . Если такая система подвергается сжимающему давлению  $p$ , она может деформироваться с разными волновыми числами  $k$  (на окружности может укладываться разное количество волн, равное  $k \geq 2$ ). В такой системе критическое давление на оболочку без сердцевин равно  $p_0 = \frac{E_s}{4(1-\nu_s^2)} \left(\frac{t}{a}\right)^3$ , а для струи можно получить соотношение

$$\frac{p}{p_0(1+\alpha)} = \frac{k^2 - 1}{3} + \frac{4(1-\nu_s^2) \left(\frac{E_c}{E_s}\right) \left(\frac{a}{t}\right)^3}{(1+\nu_c)[2k(1-\nu_c) - (1-2\nu_c)]}$$

$$\text{в котором использован коэффициент } \alpha = \frac{(1-\nu_s^2)}{(1+\nu_c)(1-2\nu_c)} \left(\frac{E_c}{E_s}\right) \left(\frac{a}{t}\right).$$

Это выражение получено при больших значениях коэффициентов Пуассона  $\nu_c$ ,  $\nu_s > 0.4$ , т.е. для систем, для которых объем близок к постоянному ( $\nu=0.5$ ). Оно дает множество значений  $p(k)$ , и струя теряет устойчивость при минимальном из них. Если минимизировать это выражение по  $k$ , то можно получить оценку критического значения  $k_{\text{crit}}$  (и соответствующей длины волны  $\lambda_{\text{crit}}=2\pi/k_{\text{crit}}$ ) в виде

$$k_{\text{crit}} = \left(\frac{a}{t}\right)^3 \sqrt{\left(\frac{3\bar{E}_c}{\bar{E}_s}\right)} \text{ где } \bar{E} = \frac{E}{1-\nu^2}$$

Эти соотношения позволяют проследить некоторые закономерности изменения морфологии струи и полученного из нее волокна при вариации свойств системы (изменении типа растворителя, концентрации и т.п.). Электроформованная лента (рисунок 14 Б)

является предельным случаем морщинистого волокна, который соответствует волновому числу  $k=2$ . Для белков особенно характерна тенденция к формированию лент в широком диапазоне условий [91].

Итак, электроформование является сложным динамическим процессом, который управляется большим количеством факторов. Аналитическое описание процесса электроформования возможно, и позволяет объяснить многие экспериментально наблюдаемые закономерности, но имеет ограниченную применимость. Поэтому многие работы, связанные с электроформованием, опираются исключительно на эмпирический выбор условий. В сравнении с другими подходами к изготовлению тонких полимерных волокон, электроформование представляется более гибким, и эта гибкость обеспечила ему как широкое признание со стороны научного сообщества, так и центральное место в данной работе.

#### **1.1.4. Самоорганизация и самосборка**

Многие полимеры за счет особенностей химической структуры способны самопроизвольно формировать тонкие субмикронные волокна, и поэтому самосборку (самоорганизацию) можно рассматривать как способ их получения. Способность к самосборке особенно характерна для природных полимеров. В качестве классических примеров можно привести коллаген, основной белок соединительной ткани, и целлюлозу, полисахарид, из которого состоит клеточная стенка растений (Рисунок 15 А и Б, соответственно). Молекулы коллагена обладают четвертичной структурой: каждая молекула представляет собой три сцепленные полипептидные цепи, взаимодействие между которыми осуществляется, прежде всего, водородными связями. Длина молекулы составляет приблизительно 300 нм, диаметр составляет  $\sim 1.5$  нм. Эти молекулы способны агрегировать с формированием более крупных волокнистых структур с диаметром 10-300 нм [93]. Коллагены – это семейство белков, и наиболее распространенным является коллаген I типа. Из него делают гидрогели и мембраны, которые обладают отличной биосовместимостью, и используются как в лабораторной, так и в клинической практике.

Целлюлоза – это полимер глюкозы, который может формировать различные наноструктуры, нанокристаллы и нанофибриллы, также в отдельный класс выделяют бактериальную целлюлозу. Для молекул целлюлозы, как и для молекул коллагена, характерно формирование внутри- и межмолекулярных водородных связей. С точки зрения

химической структуры, целлюлоза похожа на крахмал: оба эти вещества имеют молекулярную формулу  $(C_6H_{10}O_5)_n$  и являются полимерами глюкозы. Однако из-за разницы в способе соединения звеньев глюкозы и расположении водородных связей, крахмал представляет собой водорастворимое вещество, а целлюлоза не растворяется в воде.

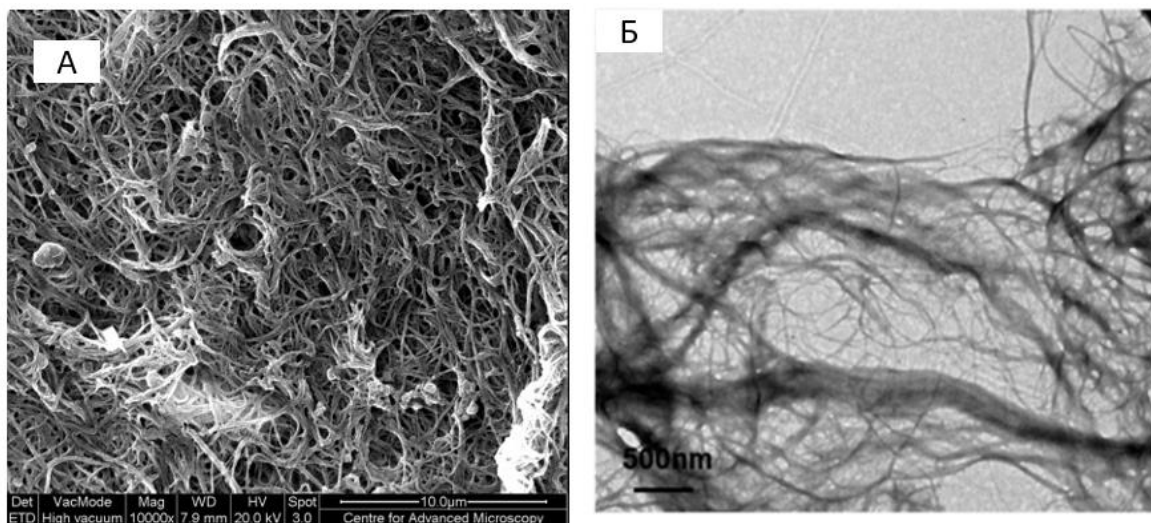


Рисунок 15 – Примеры тонких волокон, сформированных в результате самосборки. Нановолокна коллагена (А [94]) и целлюлозы (Б [93]).

Кроме коллагена и целлюлозы, к формированию тонких волокон способны многие природные полимеры: хитозан, фиброин шелка, спидроины (белки паутины), зеин (растительный белок, получаемый из кукурузы) и другие [93]. Среди полимеров, способных к самопроизвольному формированию волокон, особого внимания заслуживают амилоидоподобные белки и пептиды. Их обсуждение связано с амилоидозами – болезнями, которые сопровождаются формированием в организме нерастворимых агрегатов, имеющих белковую или пептидную основу (болезни Альцгеймера, Паркинсона, коровье бешенство и другие). Классическое определение амилоидных фибрилл включает в себя четыре характеристические особенности [95], [96]:

1. Диаметр фибрилл составляет порядка  $\sim 1$  нм
2. Пептиды в фибрилле обычно образуют  $\beta$ -листы так, что водородные связи направлены вдоль фибриллы, а пептидные цепи перпендикулярно ей (cross- $\beta$ -spine, Рисунок 16). Такая укладка идентифицируется методом рентгеноструктурного анализа
3. Способность связывать специфические красители – Конго красный и тиофлавин Т

#### 4. Фибриллы нерастворимы в условиях живого организма

Прокомментируем каждое из четырех свойств более подробно. Первое свойство, способность к формированию тонких фибрилл, проверяется с помощью микроскопии высокого разрешения, прежде всего, ПЭМ и АСМ. Исследованию структуры и морфологии амилоидных фибрилл посвящено множество работ, и показано, что для многих белков и пептидов характерна иерархическая структура фибрилл, в которые они способны собираться [2], [97], [98]. Это значит, что молекулы вначале объединяются в тонкие протофибриллы, которые затем могут объединяться в более и более крупные. С точки зрения формы, многие амилоидные волокна отлично описываются персистентной моделью, причем для некоторых характерна очень высокая персистентная длина (например, для фибрилл  $\beta$ -лактоглобулина может быть  $l_p \approx 2$  мкм) [98].

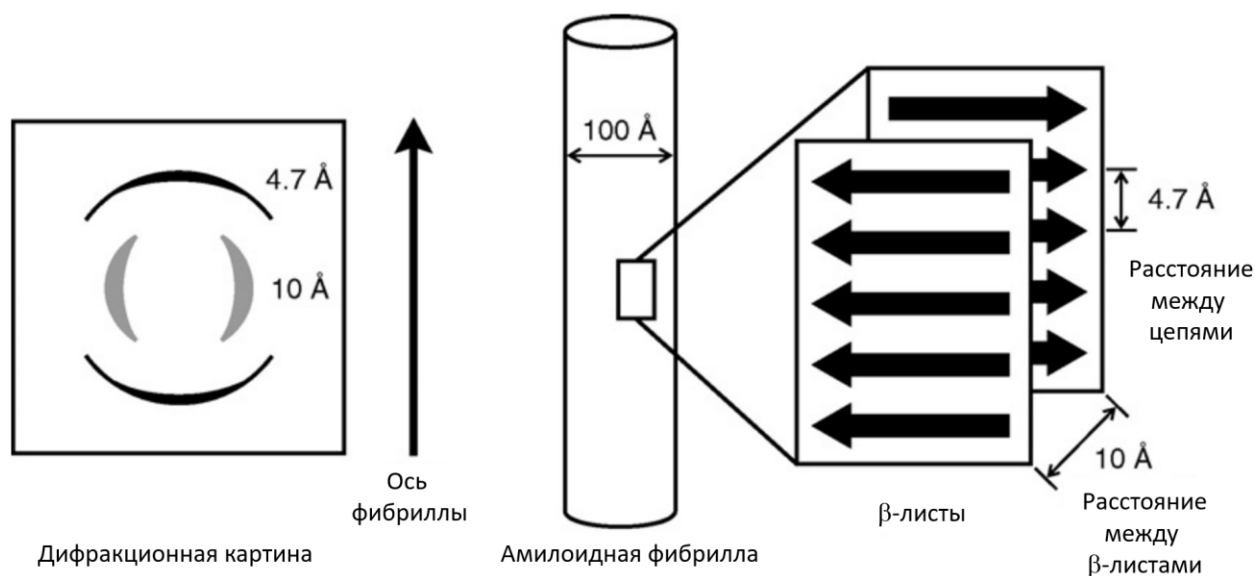


Рисунок 16 – Определение укладки пептидных цепей в составе амилоидных или амилоидоподобных фибрилл методом рентгеноструктурного анализа [95]. А – типичная дифракционная картина, полученная от ориентированных фибрилл, Б – схема укладки молекул в фибрилле.

Укладка пептидных фибрилл в составе фибриллы обычно имеет особенность: пептидные цепи формируют  $\beta$ -листы и располагаются преимущественно поперек оси фибриллы. Эта особенность может быть экспериментально установлена с помощью рентгеноструктурного анализа, причем для этого исследования фибриллы ориентируют вдоль одного направления (это может быть сделано, например, с помощью интенсивной сдвиговой деформации в растворе [99]) и от такого ориентированного образца

регистрируют картину дифракции (Рисунок 16 А). На ней наблюдается выделенное направление, совпадающее с осью фибрилл, рефлексы вблизи 4.7А, соответствующие расстоянию между пептидными цепями в  $\beta$ -листе, и рефлексы вблизи 1 нм, соответствующие расстоянию между  $\beta$ -листами, сложенными в стопку (Рисунок 16 Б). Расположение пептидных цепей поперек фибрилл может обеспечивать им высокую жесткость и сравнительно большую персистентную длину.

Третье характеристическое свойство, способность связывать амилоид-специфические красители [100], также связано с  $\beta$ -листами, входящими в состав фибрилл. Хотя известно много амилоид-специфических красителей, наиболее популярными являются Конго красный и тиофлавин Т (Рисунок 17). Это низкомолекулярные соединения, которые способны адсорбироваться на достаточно протяженные  $\beta$ -листы, и при этом изменять свои оптические характеристики.

Конго красный в настоящее время используется сравнительно редко, но он сыграл значительную роль в исследовании амилоидозов, и его необходимо коротко упомянуть. Его использовали при гистологических исследованиях срезов мозга пациентов с болезнью Альцгеймера, и выяснилось, что амилоидные бляшки после обработки Конго красным приобретают зеленое двулучепреломление [101], [102]. Они становятся видны в скрещенных поляризаторах, причем имеют зеленоватый цвет. Впоследствии было установлено, что при связывании с амилоидными фибриллами в растворе Конго красный изменяет спектр поглощения, и в результате разностный спектр приобретает пик вблизи 540 нм (Рисунок 18 А). Считается, что оптические свойства красителя изменяются за счет того, что после адсорбции на поверхность фибриллы прекращается вращательное движение молекулы вокруг центральной С-С связи [100]. Данные о размерах молекул (приблизительно 26 А) и результаты молекулярного моделирования указывают, что для стабилизации Конго красного на поверхности фибриллы необходимо пять цепей, уложенных в  $\beta$ -лист.

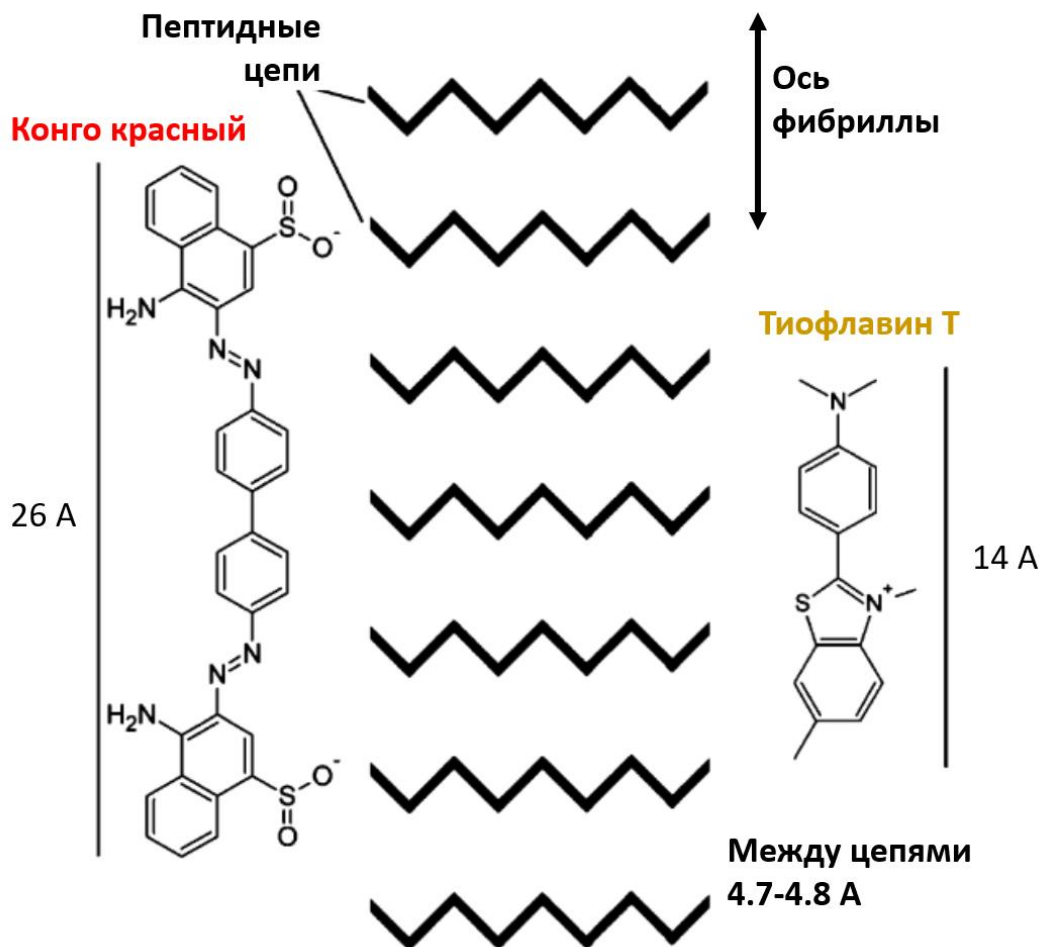


Рисунок 17 – Схема связывания молекул красителей Конго красного и тиофлавина Т с амилоидной фибриллой [100].

В отличие от Конго красного, тиофлавин Т является флуоресцентным красителем. В свободном состоянии в растворе максимумы его возбуждения и эмиссии составляют приблизительно 342 и 430 нм, а интенсивность свечения слабая (Рисунок 18 Б). После связывания с поверхностью фибриллы интенсивность флуоресценции резко возрастает, а максимумы возбуждения и эмиссии смещаются к значениям 442 и 492 нм (Рисунок 18 В). Взаимодействие тиофлавина Т с амилоидными фибриллами происходит быстрее, чем взаимодействие Конго красного (1-5 минут против 30-40 минут), поэтому для мониторинга кинетики образования фибрилл в растворе обычно используют именно тиофлавин Т.

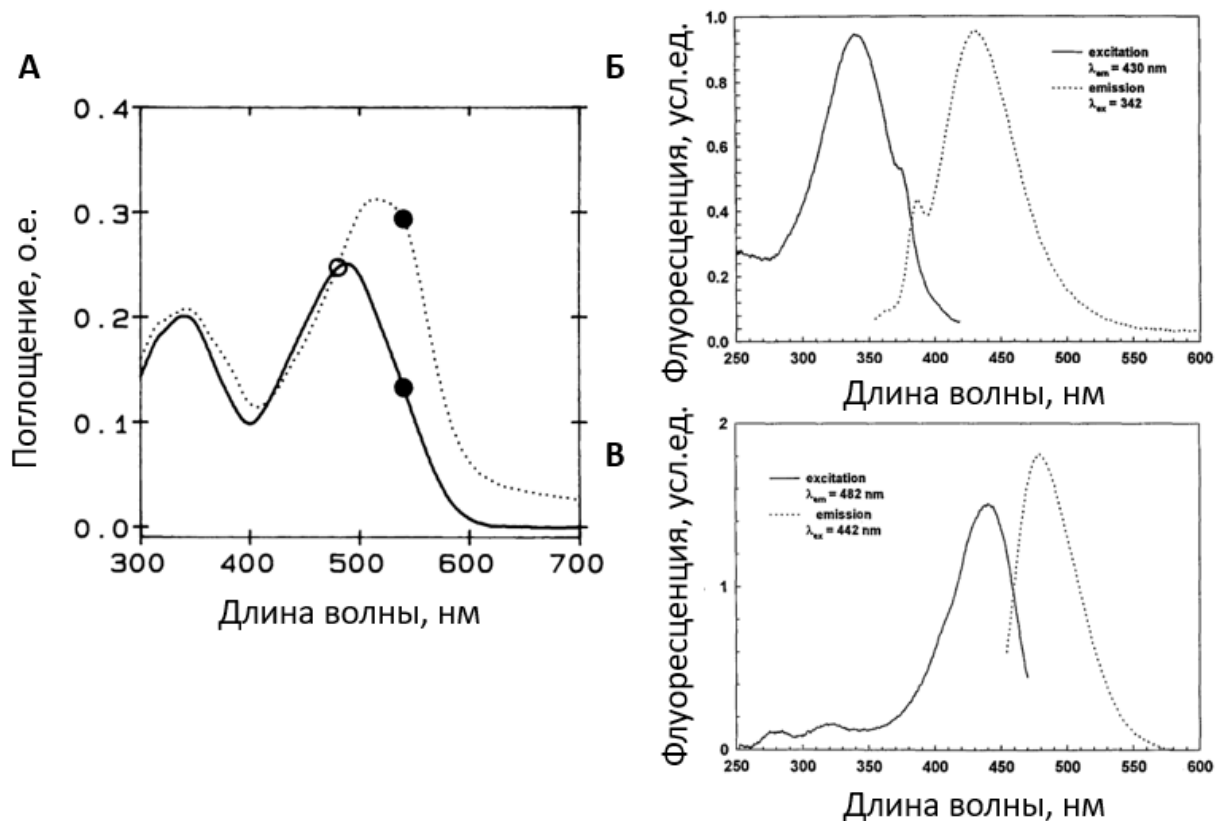


Рисунок 18 – Спектральные характеристики амилоид-специфических красителей. А – спектры поглощения 7 мкМ раствора конго красного в свободном состоянии и в смеси с 5 мкМ фибрилл инсулина [101]. Б и В – спектры возбуждения и эмиссии 5 мкМ тиофлавина Т в свободном состоянии (Б) и в смеси с 2 мкМ фибрилл амилоид-β пептида (1-42) (В) [103].

Описываемые красители способны изменять свои оптические характеристики не только при взаимодействии с амилоидными фибриллами, но и при других условиях, не связанных с амилоидозами [100]. Например, тиофлавин Т способен изменять свои спектры возбуждения и эмиссии при взаимодействии с ДНК [104]. Тем не менее, несмотря на отсутствие стопроцентной специфичности, эти инструменты являются практически незаменимыми в работе с амилоидами.

Заключительное, четвертое характеристическое свойство амилоидных фибрилл – это их устойчивость в организме. Они устойчивы к действию протеиназ и других протеолитических ферментов, и поэтому их накопление приводит к формированию нерастворимых агрегатов [102]. Если фибриллы обладают всеми четырьмя указанными выше свойствами, то их называют амилоидными, однако если только некоторыми из четырех свойств, то более корректно называть их амилоидоподобными [95], [96].

Естественно, список амилоидоподобных фибрилл во много раз обширнее, чем амилоидных. К ним относятся некоторые биосовместимые фибриллы, например, состоящие из пептидов RADA-16-I, которые являются одним из объектов исследования в данной работе (раздел 2.2). Это пептид, состоящий из четырех повторяющихся блоков аргинин-аланин-аспарагиновая кислота-аланин, его молекулярная масса обычно составляет приблизительно 1680 Да, и может незначительно варьироваться за счет использования разных концевых групп. В водных растворах он активно формирует фибриллы, и обычно считается, что молекулы уложены в  $\beta$ -листы, а пептидные цепи ориентированы перпендикулярно оси фибриллы [105-107]. Несмотря на то, что такая структура соответствует амилоидной, фибриллы RADA-16-I биосовместимы и биоразлагаемы (они не обладают четвертым характеристическим свойством). При концентрации  $\sim 10$  мг/мл и выше этот пептид гелируется, и гели на его основе применяются в медицине как хирургические филлеры и носители для лекарств [108], [109]. Таким образом, фибриллы RADA-16-I являются представителем класса амилоидоподобных фибрилл.

Физико-химические причины, которые обеспечивают разницу между амилоидными и амилоидоподобными волокнами, являются предметом активного изучения [96], [110]. Укладка cross- $\beta$ -spine (Рисунок 16 А) наблюдается в фибриллах из очень разных пептидов и белков, имеющих разные аминокислотные последовательности. Конформация вытянутых цепей в составе волокна, которую может принять практически любой пептид, стабилизирована водородными связями. Иногда говорят, что подобная укладка, богатая  $\beta$ -листами, заставляет белок «забыть» о его аминокислотной последовательности и нативной конформации за счет того, что она очень выгодна с точки зрения энергии. Действительно, расчеты энергии на примере пептидов аланина показывают, что конформация  $\beta$ -листов является наиболее стабильной конформацией как в вакууме, так и в водном окружении [111]. При этом в состав амилоидного волокна обычно входят пептиды (белки) строго одного и того же типа, а включение пептидов другой последовательности маловероятно и зависит от гомологии последовательностей зародыша и присоединяющихся к нему звеньев [110]. Один из механизмов, с помощью которых белки противостоят интенсивной агрегации, состоит в том, что в мультидоменных белках часто наблюдаются вариации последовательностей между доменами, а если в состав белков входят домены с высокой степенью гомологии, то такие белки более склонны к агрегации [112]. Чтобы обеспечить

возможность сворачивания в правильную конформацию, в состав многих природных белков входят специфические аминокислотные последовательности (например, содержащие пролин или заряженные аминокислотные остатки, расположенные определенным образом [113]), которые помогают белку принять нативную конформацию и не скатиться в энергетический минимум, который достигается амилоидоподобной структурой.

Тонкие полимерные волокна и фибриллы, полученные с помощью самоорганизации, имеют множество применений в медицине, безопасности (разработке сенсоров), некоторых специфических задачах из области материаловедения [114]. Но в широком контексте самоорганизация как способ получения тонких волокон применима только при определенных особенностях молекулярной структуры. Химическая структура вещества должна обеспечивать возможность самоорганизации (например, возникновения водородных связей, стабилизирующих фибриллы). Поэтому в контексте получения тонких полимерных волокон самоорганизация является важным и популярным, но не универсальным подходом.

#### **1.1.5. Специфические методы формирования тонких волокон**

В заключительном разделе коротко обсудим еще некоторые специфические подходы к изготовлению тонких волокон и нитей из полимеров: селективное фотоотверждение, темплатный синтез и формирование волокон с помощью фазового разделения.

Селективное фотоотверждение (лазерная фотополимеризация, стереолитография) – это метод изготовления сложных трехмерных структур путем послойного отверждения светочувствительного материала [115-117]. Это один из методов 3D-печати, который наряду с методом послойного наплавления получил широкую популярность в последнее десятилетие. Он особенно интересен для биомедицинских приложений, например, для изготовления полимерных каркасов тканеинженерных конструкций, т.к. он позволяет с высокой пространственной точностью контролировать форму и размеры создаваемых структур. Кроме того, он не требует высоких температур, и может использоваться для систем, в которых содержатся чувствительные к температуре объекты, например биополимеры или клетки. Этот подход позволяет изготавливать не только тонкие нити, но очень сложные трехмерные конструкции, которые не удастся изготовить другими методами.

При использовании селективного фотоотверждения подразумевается, что используемое вещество (мономер, олигомер или полимер) является светочувствительным. Можно использовать традиционные фоторезисты и светочувствительные смолы, но если применять эту методику для создания биоразлагаемых конструкций, то оказывается, что популярные в тканевой инженерии биоразлагаемые полимеры не обладают светочувствительными свойствами. Для них были предложены процедуры химической модификации для введения в состав светочувствительных функциональных групп. Наиболее типичный пример – это метакрилирование белков (желатина, коллагена, фиброина шелка и других). Это может быть сделано путем их обработки метакрилирующими агентами, например, метакриловым ангидридом, глицидил метакрилатом или 2-изоцианатэтилметакрилатом [118]. Более экзотический вариант – это введение в состав полимера фенол-содержащих боковых групп и последующая полимеризация светом в присутствии рутения [119], [120]. В целом, разработка биосовместимого светочувствительного состава для стереолитографии является актуальной задачей.

В качестве источника света в стереолитографии часто используют лазер с длиной волны 355 или 405 нм. Его либо фокусируют на поверхность ванны с жидким мономером, либо освещают поверхность через маску или систему подвижных зеркал, чтобы подвергнуть обработке всю поверхность одновременно, аналогично тому, как это делается в традиционной фотолитографии. Кроме того, для получения наилучшего пространственного разрешения иногда используют двухфотонную стереолитографию. В ней используют не фиолетовый, а инфракрасный лазер (780–800 нм), а фотополимеризация происходит при двухфотонном поглощении. При учете этого процесса уравнение распространения интенсивности принимает вид [121], [122]

$$\frac{dI}{dz} = -\alpha I - \beta I^2$$

Если пренебречь линейным поглощением, то получаем  $\frac{dI}{dz} = -\beta I^2$  и зависимость интенсивности от глубины проникновения записывается в виде

$$I(z) = \frac{I_0}{1 + \beta I_0 z}$$

В этой формуле  $\beta$  – это коэффициент двухфотонного поглощения (он измеряется в см/Вт). Поскольку величина поглощения пропорциональна квадрату интенсивности, этот подход позволяет достичь наилучшего разрешения. Допустим, сфокусированный лазерный луч имеет профиль интенсивности вида  $I = I_{max} e^{-2r^2/w^2}$ , где  $w$  – радиус пучка. В этом случае квадрат интенсивности  $I^2$  описывается аналогичной формулой  $I^2 = I_{max}^2 e^{-4r^2/w^2}$ , но с радиусом  $w/\sqrt{2}$  меньше, чем при обычной однофотонной фотополимеризации. Это уменьшение обеспечивает преимущество двухфотонной фотополимеризации перед однофотонной с точки зрения разрешения. Для дополнительной оптимизации разрешения используются импульсные лазеры с малой длительностью импульсов, подпороговая мощность (чтобы реакция сшивания происходила только в минимальной области пространства, где достигается достаточная плотность энергии), и конечно, высокоапертурные объективы [117].

Разрешение стереолитографии обычно оценивают через минимальный размер сформированной структуры, например, минимальной ширины щели или наименьшего диаметра нити. Обычная литография легко достигает порядка  $\sim 10$  нм, но для биосовместимых полимеров разрешение лежит в диапазоне порядка  $\sim 10$  мкм [115]. Поэтому в контексте тканевой инженерии о субмикронных структурах, сформированных с помощью стереолитографии говорят сравнительно редко. Тем не менее, такие примеры есть. С помощью двухфотонной стереолитографии были получены субмикронные нити из модифицированной целлюлозы (их ширина составляла 220-230 нм) [123]. Этим же методом были изготовлены микроскопические pH-чувствительные элементы из смеси фоторезиста SU-8 и альбумина (БСА) [124]. В целом, стереолитография представляется очень эффективным методом получения микро- и наноструктур, в том числе, нитей и волокон. Но этот метод сравнительно медленный, дорогостоящий и накладывает очень специфические требования на химическую структуру используемых веществ (в этом аспекте он похож на самоорганизацию).

Темплатный синтез – это способ формирования тонких полимерных волокон, при котором они возникают внутри тонких пор; это происходит либо путем полимеризации мономера в объеме пор, либо путем пропускания раствора или расплава через поры [125]. В последнем случае процесс формально аналогичен экструзии, однако при субмикронном

диаметре пор проникновение полимера в них обеспечивается не давлением, а силой поверхностного натяжения. В таких работах обычно используют мембраны с калиброванными порами, это могут быть мембраны из анодированного оксида алюминия или трековые мембраны.

Этот подход был предложен, по-видимому, в 1994 году в работе [126]. Мембрана из анодированного оксида алюминия (АОО) представляет собой пористую пластину (Рисунок 19 А), в которой расстояние типичное между порами составляет 100-200 нм. На сколе видно, что поры вытянутые, и их длина может составлять порядка  $\sim 1-10$  мкм (Рисунок 19 Б). В зависимости от технологии изготовления они могут быть закрыты с одной стороны, или же могут быть сквозными. Если заполнить поры полимером, а затем растворить АОО в щелочи, то сформируются тонкие полимерные волокна (Рисунок 19 В).

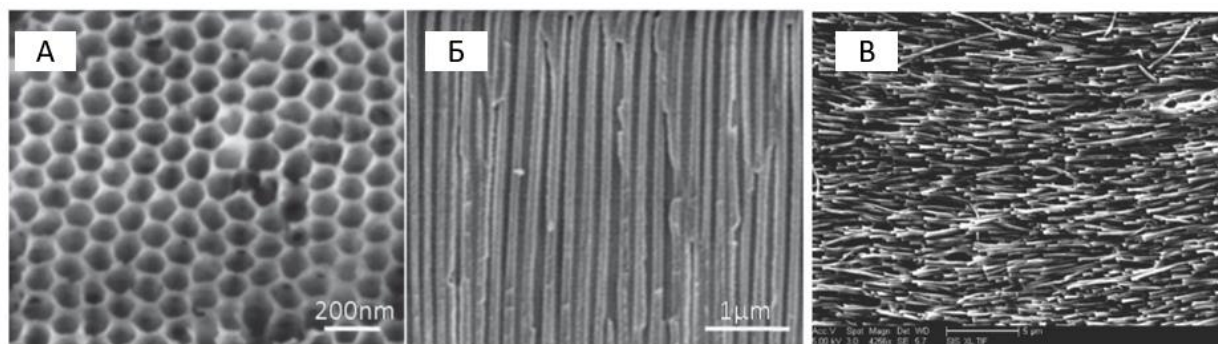


Рисунок 19 – СЭМ-изображения поверхности мембраны из АОО (А), скола мембраны из АОО (Б) и тонких волокон ПКЛ, сформированных в порах мембраны из АОО (В) [125], [127].

Общая схема процесса изготовления волокон с помощью этого подхода представлена на рисунке 20. Пленку твердого полимера приводят в контакт с пористой мембраной и плавят. Расплав или расплав полимера может затекать в поры АОО под действием капиллярных сил, обычно считается, что причиной этого процесса является высокая энергия межфазной границы между внутренней поверхностью пор и воздухом. В некоторых случаях проникновение полимера в поры можно стимулировать давлением на полимер [128] или снижением давления на свободной стороне АОО [129]. Возможность формирования тонких волокон таким способом была показана для ПКЛ [130], ПЛГА, сополимеров ПКЛ с ПЛА [127], ПЭТФ [128], ПС, ПММА [129] и других полимеров.

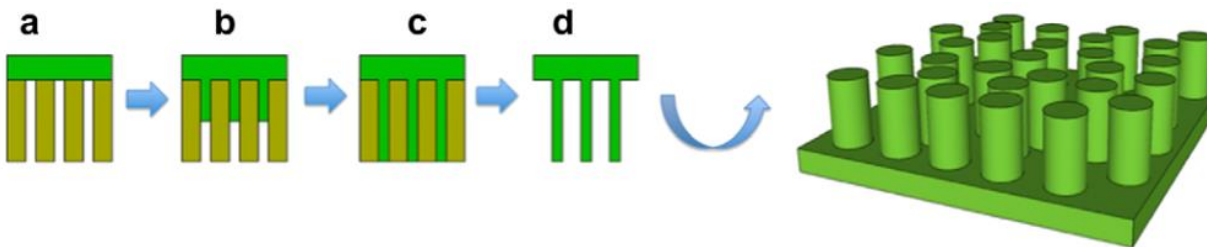


Рисунок 20 – Схема процесса получения полимерных нановолокон с помощью пористой мембраны [130]. а – нанесение полимера на мембрану, b, c – проникновение полимера в поры, d – тонкие фибриллы на поверхности полимерной пленки после растворения АОО.

В результате описываемого процесса на поверхности полимерной пленки возникает множество параллельно расположенных волокон или трубок, напоминающих ворсинки щетки. Их диаметры либо соответствуют диаметру пор [128], либо оказываются больше, чем диаметр пор [127]. Описываемый процесс привлекает значительный интерес исследователей: динамика полимера в тонких порах, закономерности его кристаллизации и свойства сформированных волокон являются предметом активного изучения [131]. Однако он не получил широкого распространения, и это отчасти связано с необходимостью растворения пористых мембран из АОО – основного компонента, используемого для формирования волокон.

В заключение этого раздела обсудим использование фазового разделения для формирования пористых полимерных структур и, в том числе, конструкций, состоящих из тонких волокон. Обычно использование этого подхода подразумевает выполнение следующих шагов [132]:

1. Готовят раствор полимера (или его смесь с легко удаляемым твердым веществом)
2. Полученный раствор (или однородную смесь) помещают в форму, которая соответствует форме изделия
3. Провоцируют фазовое разделение в системе, обычно это делается путем охлаждения, при котором система разделяется на две фазы: обогащенную полимером и обогащенную растворителем.
4. Растворитель удаляют, чтобы получить готовое пористое изделие

В некоторых случаях используют дополнительные вещества: вносят в систему осадитель полимера или дополнительное активное вещество, например, низкомолекулярное лекарство, которое остается в полимерной матрице.

В модели Флори-Хаггинса изменение свободной энергии Гиббса при смешивании двух полимеров или полимера и растворителя  $\Delta G_{mix}$  выражается формулой [133], [134]

$$\frac{\Delta G_{mix}}{kT} = \frac{\phi_p \ln(\phi_p)}{v_p N_p} + \frac{\phi_s \ln(\phi_s)}{v_s N_s} + \chi \frac{\phi_p \phi_s}{v}$$

В этой формуле  $\phi_p$  и  $\phi_s$  – это объемные доли смешиваемых веществ,  $v_p$ ,  $v_s$  – объемы мономерных звеньев (или повторяющейся единицы);  $N_p$ ,  $N_s$  – степени полимеризации (для низкомолекулярного растворителя  $N_s=1$ );  $v$  – объем сравнения, который часто принимают равным  $\sqrt{v_s v_p}$ ;  $\chi$  – параметр Флори-Хаггинса. Часто объемы  $v_p$ ,  $v_s$  и  $v$  считают равными единице, и в этом случае формула приобретает вид

$$\frac{\Delta G_{mix}}{kT} = \frac{\phi_p \ln(\phi_p)}{N_p} + \frac{\phi_s \ln(\phi_s)}{N_s} + \chi \phi_p \phi_s$$

Рассмотрим это соотношение для смеси полимера и растворителя. Условие существования равновесной однородной смеси записывается как совокупность из двух условий:  $\Delta G_{mix} < 0$  и  $(\frac{\partial^2 \Delta G_{mix}}{\partial \phi_p^2})_{T,P} > 0$ . Разные случаи проиллюстрированы на рисунке 21.

Случай предельной несовместимости показан в левой колонке, в ней при любом соотношении компонент выполнено условие  $\Delta G_{mix} > 0$ , т.е. совмещение компонент термодинамически невыгодно. Случай предельной растворимости проиллюстрирован в правой колонке: при любом соотношении компонент  $\Delta G_{mix} < 0$ . Однако наиболее распространенный и реалистичный случай проиллюстрирован на средней части рисунка. В этом случае на зависимости  $\Delta G_{mix}(\phi_p)$  присутствуют две точки перегиба, которые ограничивают нестабильную область составов, в которой  $(\frac{\partial^2 \Delta G_{mix}}{\partial \phi_p^2})_{T,P} < 0$  и система стремится разделиться на две фазы с разными  $\phi_p$ . Если при охлаждении гомогенного раствора мы попадаем в эту область, то произойдет разделение фаз, и оно может привести к формированию тонких полимерных волокон. Методом разделения фаз получают разные пористые структуры, в которых размер, форма и взаимное расположение пор зависят от параметров процесса: изначальной концентрации раствора, используемых температур, способа удаления растворителя, эффектов от дополнительных компонент смеси [135].

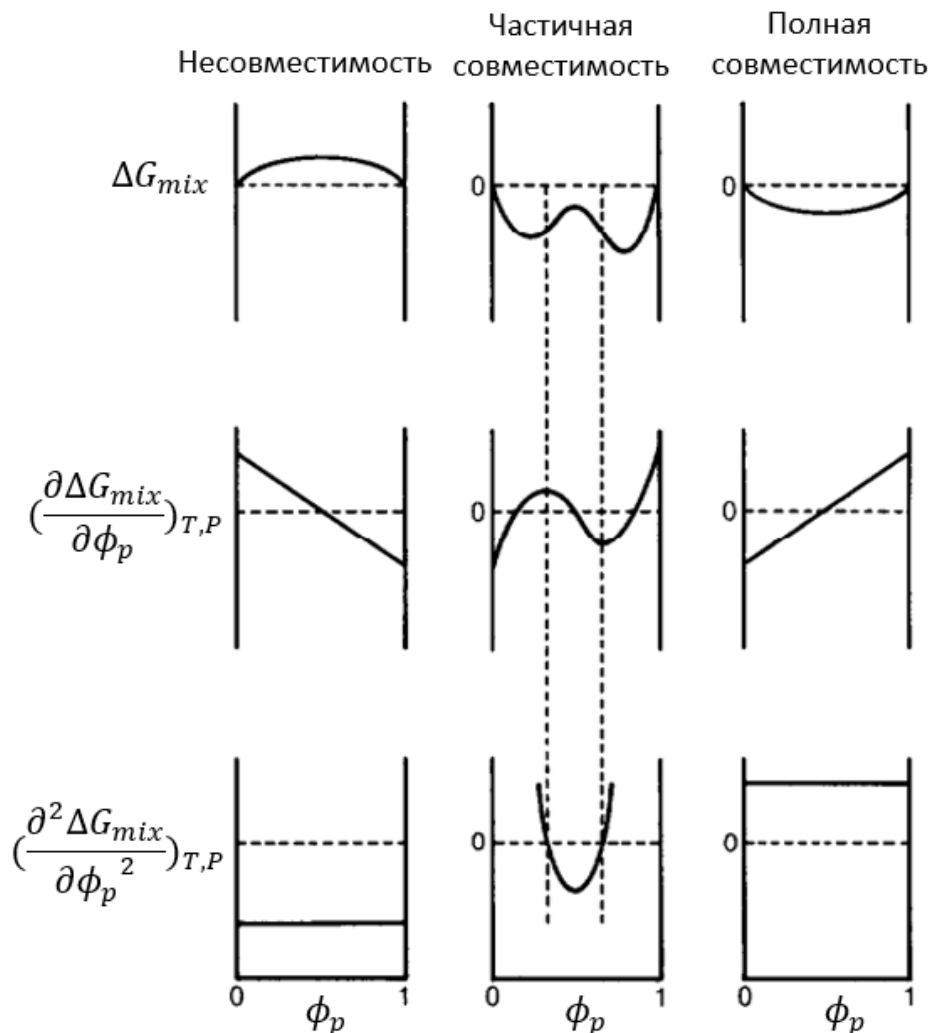


Рисунок 21 – Схематичные графики зависимости разности свободных энергий Гиббса  $\Delta G_{mix}$  от доли полимера в смеси  $\phi_s$ , а также соответствующие зависимости первой и второй производной от  $\Delta G_{mix}$  по  $\phi_s$  [134].

Наиболее характерный пример формирования тонких волокон методом разделения фаз описан в работе [136]. В ней показано, что охлаждение растворов полиэфигов (ПЛГА и ПЛА с различным стереоизомерным составом) в тетрагидрофуране позволяет получить волокнистый структуры со средним диаметром 160-170 нм (диаметры волокон лежали в диапазоне 50-500 нм, Рисунок 22). Кроме тетрагидрофурана, использовали множество других одно- и двухкомпонентных растворителей: диметилформамид, пиридин и другие. Растворы готовили при температуре 50-60°C, а затем гелировали при температуре 8-15°C. При понижении температуры происходило разделение фаз, и система приобретала механическую жесткость (переходила из состояния раствора в состояние вязкоупругого

тела), после этого растворитель заменяли на воду путем длительной инкубации заготовке в воде. В конце ее замораживали и подвергали лиофильной сушке. В результате описанных процедур формировалась сетка тонких волокон, причем их средний диаметр слабо зависел от концентрации раствора – выяснилось, что концентрация влияла на пористость и механические свойства значительно сильнее, чем на диаметры. Морфология сформированных структур зависела от термического режима: при некоторых температурах формировались не волокна, а хлопья.

В целом, в контексте получения тонких полимерных волокон метод фазового разделения имеет явные преимущества перед многими другими. Он практически не требует специфического оборудования, как электроформование или экструзия, а сформированные с его помощью изделия могут быть изготовлены сложной формы, в том числе, в форме персонализированных анатомических структур. В то же время, обычно этим методом изготавливают не фибриллярные конструкции, а пористые, т.е. полимер в них находится в виде хлопьев, пластов, гранул и других структур [135].

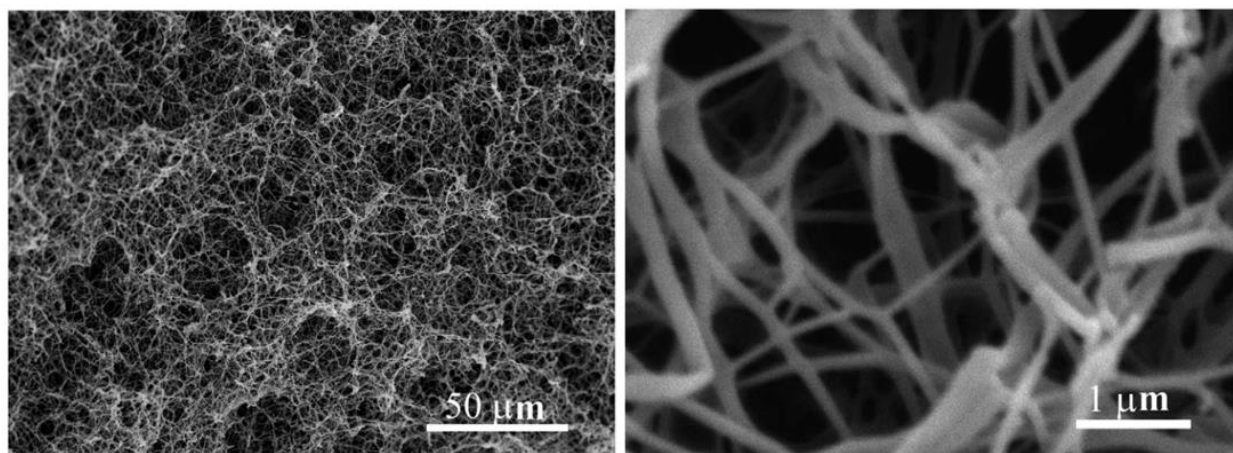


Рисунок 22 – СЭМ-изображения волокнистых структур из ПЛА, сформированных методом разделения фаз [136].

Итак, были описаны различные подходы к формированию тонких полимерных волокон: механическая вытяжка, экструзия, электроформование, самосборка, селективное фотоотверждение, темплатное формование, метод разделения фаз. Среди перечисленных подходов, наиболее актуальным и гибким представляется электроформование – многие авторы ставят его в центр рассмотрения [3], [61], и в данной работе ему также уделяется максимальное внимание. В следующем разделе будут более подробно рассмотрены некоторые вопросы, связанные с электроформованными волокнами и их применением.

## 1.2. Особенности структуры и применений электроформованных волокон

### 1.2.1. Использование электроформованных мембран в регенеративной медицине

Электроформованные мембраны по своей структуре сходны с внеклеточным матриксом мягких тканей – это сходство упоминалось выше в разделе 1.1.3. В медицине используются электроформованные изделия, изготовленные из биосовместимых полимеров: биоразлагаемых полиэфиров, структурных белков (например, коллагена или фиброина), некоторых полиуретанов, хитозана, и других. Для этих изделий можно выделить как минимум три медицинских применения: раневые покрытия, разлагаемые импланты и покрытия для металлических имплантов [62], [137]. Кроме того, для каждого из перечисленных типов изделий используют электроформованные мембраны, модифицированные или загруженные лекарственными препаратами и другими биологически активными веществами. В связи с этим часто говорят об использовании полимерных нановолокон для пролонгированного высвобождения и доставки лекарств [138].

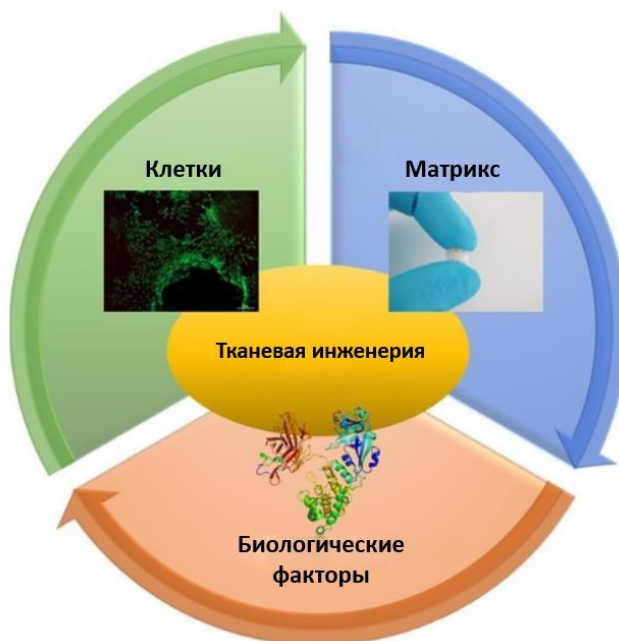


Рисунок 23 – Концепция тканевой инженерии: объединение клеток, матрикса и биологических факторов для создания искусственного органа [139].

Можно рассмотреть электроформование и другие подходы к изготовлению тонких полимерных волокон с точки зрения концепции тканевой инженерии (Рисунок 23) [139], [140]. Согласно этой концепции, задача формирования искусственной ткани или органа для

пациента может быть решена путем объединения трех фундаментально различных компонент – клеток, внеклеточного матрикса (каркаса, скаффолда) и биологических факторов. Каждая из трех компонент необходима для функционирования тканеинженерной конструкции в целом. Клетки могут быть получены от пациента, либо могут быть использованы донорские клетки; обычно это стволовые клетки или набирающие стремительную популярность индуцированные плюрипотентные стволовые клетки [141]. Биологические факторы – это факторы роста и дифференцировки, которые направляют развитие клеток, а также вспомогательные вещества, например, противовоспалительные лекарства. Внеклеточный матрикс – это структура, поддерживающая механическую целостность конструкции и обеспечивающая поддержку клеток. В костях внеклеточный матрикс минерализован, а в мягких тканях он представляет собой волокнистые структуры, и стремление воспроизвести такие структуры в лаборатории стимулирует интерес к тонким полимерным волокнам.

Концепция трех компонент тканеинженерной конструкции требует некоторых дополнительных комментариев. Каждая из трех компонент сама по себе может быть полезным биотехнологическим или медицинским продуктом. Например, биоразлагаемая электроформованная мембрана (без клеток и без сигнальных молекул) может быть использована как раневое покрытие – такие изделия уже есть на рынке, например «Хитопран» из хитозана и «Фибрасофт» из смеси фиброина шелка, полилактида и коллагена. Сигнальные молекулы, например фактор роста эндотелия сосудов VEGF или костный морфогенетический белок BMP, могут быть самостоятельными терапевтическими агентами. Могут быть и парные комбинации составляющих, например, полимерная мембрана, витализированная клетками пациента или донора, может использоваться для восстановления кожи более эффективно, чем ее бесклеточный аналог [142].

Современные технологии, прежде всего технологии генетического редактирования, а также технологии получения сфероидов и манипуляций с ними [143], скорректировали и усложнили указанную выше тканеинженерную «триаду». Тем не менее, задача формирования тонких волокон для создания искусственных аналогов внеклеточного матрикса еще долго сохранит свою актуальность.

Кроме плоских мембран, электроформование может использоваться для изготовления изделий с более сложной геометрией, например трубок [144]. Это достигается

использованием коллектора, представляющего собой вращающийся цилиндр. Электроформованная трубка может использоваться как заготовка для искусственного сосуда, трахеи или другой цилиндрической анатомической структуры, или в качестве покрытий для сосудистых стентов. Описано применение электроформования для изготовления заготовки искусственного хряща, форма которого соответствует форме человеческого уха [145] – это также было достигнуто с помощью специфического коллектора.

Исследование электроформованных изделий с точки зрения биомедицинских применений обычно включает в себя комплекс методов, которые направлены на оценку биосовместимости на клетках *in vitro* и на животных *in vivo*, отсутствия токсичности, оценку сорбционной способности изделия (в частности, способности адсорбировать белки крови), кинетики деградации и, конечно, исследование терапевтической эффективности. Некоторые эксперименты, описанные в данной работе в главе 5, следуют логике биомедицинских исследований: они посвящены культивированию клеток на волокнистых мембранах для первичного подтверждения их биосовместимости.

### **1.2.2. Электроформованные мембраны сложного состава**

Электроформованные мембраны могут быть модифицированы путем внедрения дополнительных компонент в состав волокон или же путем модификации поверхности волокон. Эти подходы различаются в двух аспектах. Внедрение компонент в состав волокон требует изменений на этапе электроформования и влияет на химический состав волокон в целом. Модификация поверхности волокон является пост-обработкой уже изготовленной мембраны и изменяет преимущественно поверхность, но не объем волокон. В биомедицинских применениях оба эти подхода активно используются для расширения спектра свойств электроформованных изделий.

Модификация поверхности волокон может использовать физические методы и химические. Приведем некоторые примеры каждого из этих вариантов. Обработка поверхности полимерного изделия плазмой часто используется для ее очистки, повышения гидрофильности, а также для усиления сорбционных свойств. Обработка плазмой создает на поверхности свободные радикалы, а также новые функциональные группы, тип которых зависит от типа используемой плазмы (аргоновой, кислородной, гелиевой и т.п.). Толщина слоя полимера, на который плазма оказывает воздействие, определяется энергией частиц и

обычно составляет 10 нм или менее [146], [147]. По данным рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, после обработки биоразлагаемых полиэфиров кислородной или аргоновой плазмой на поверхности снижалось соотношение количества углерода к кислороду C/O. При использовании кислородной плазмы это было связано с прямым присоединением кислорода к полимерам в составе соответствующих функциональных групп (карбоксильных, гидроксильных). При использовании аргоновой плазмы это было связано с присоединением кислорода из воздуха к свободным радикалам, сформировавшимся на поверхности. На примере электроформованного полиакрилонитрила показано, что обработка поверхности плазмой в парах аммиака может использоваться для аминирования поверхности [148].

Обработка гидрофобных поверхностей в плазме часто используется для их гидрофилизации и усиления сорбционных свойств. Например, обработка углеродных сеток для ПЭМ в тлеющем разряде при небольшом напряжении (до ~1 кВ) является практически стандартным шагом при подготовке образцов для исследования методом ПЭМ – в данной работе он использован при исследовании тонких пептидных волокон (раздел 2.2). Применительно к электроформованным мембранам, обработка плазмой позволяет сделать их гидрофильными, и это бывает полезно для последующей модификации поверхности волокон водными растворами. Такой способ модификации использовали для электроформованных волокон из различных полимеров: ПС, ПЛА, ПЛГА, полиэфирсульфона и других [A33]. Однако в редких случаях плазменная обработка может делать мембраны более гидрофобными – это показано на примере обработки ПОБВ в плазме четырехфтористого углерода [149].

Поверхность нерастворимых в воде волокон может быть модифицирована водорастворимыми полимерами. Это часто используют в задачах подготовки мембран для культивирования клеток, а также при разработке биосенсоров. Этот прием повсеместно используется в клеточной биологии, например стекла и полимерные подложки покрывают поликатионами для улучшения адгезии клеток [150]. Считается, что адсорбция обеспечивается силами Ван-дер-Ваальса, и при этом она позволяет изменить свойства поверхности. Этот же прием применим и для поверхности электроформованных волокон: на нее можно нанести поликатионы или белки клеточной адгезии для улучшения взаимодействия с клетками, антитела или антигены для изготовления биосенсоров и т.п.

[A33]. Кроме обычной физической сорбции, для модификации поверхности используют и более сложные подходы. Например, часто используют ковалентное прикрепление белков с помощью реагентов 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и N-гидроксисукцинимид (EDC/NHS), которые обеспечивают реакцию между группами -COOH на поверхности и аминогруппами белков [151], [152]. Модификация поверхности нетканых мембран антителами использована в данной работе в главе 6.

В некоторых задачах модификации поверхности недостаточно, и необходимо изготовить мембраны так, чтобы в составе волокон были несколько компонент. Можно привести два примера задач, которые приводят к такой необходимости. Для улучшения адгезии клеток и одновременного ускорения деградации полиэфирной мембраны может быть использован желатин [A24]. Он содержит последовательности RGD (аргинин, глицин, аспарагиновая кислота), которые взаимодействуют с интегринами и способствуют клеточной адгезии, а растворимость желатина в воде позволяет мембране быстрее терять массу и открывать дополнительные участки поверхности для контакта с растворителем. Другая задача – это функционализация волокон, придание им специфических биологических свойств. Например, введение антибиотика или антисептика в состав волокон придает им антибактериальные свойства [153]. Включение в состав волокон факторов дифференцировки, например упоминавшихся выше белков BMP [154] или VEGF [155], позволяет направлять дифференцировку стволовых клеток, находящихся на электроформованном матриксе, и улучшает свойства тканеинженерной конструкции. Введение в состав мембраны трипсина или химотрипсина позволяет использовать ее в терапии некрозов и гнойных ран (подобные продукты уже есть на потребительском рынке). При этом для длительного высвобождения необходимо именно внедрять активные вещества внутрь волокон, а не наносить их на поверхность.

Простейший способ совмещения двух компонент в одном волокне – это их смешивание в общем растворителе и электроформование смеси. После испарения растворителя на коллекторе возникает нетканая мембрана, содержащая обе компоненты – это очень эффективный подход для вариации свойств мембран. Например, совмещение ПЛГА и хитозана в общем растворителе трифторуксусной кислоте (ТФА) позволяет регулировать коэффициент набухания смесевой мембраны в воде [156]. В некоторых случаях совмещение компонент, подвергаемых электроформованию, в общем растворителе

приводит к тому, что волокна приобретают необычные свойства, которые не наблюдаются у компонент в отдельности. Например, в нашей работе [A20] показано, что электроформованные мембраны, изготовленные из смеси ПОБВ и БСА (7:3 по массе) в общем растворителе ГФИП, обладают необычным термическим свойством (Рисунок 24 А). На первом нагреве двухкомпонентной электроформованной мембраны наблюдается необычный эндотермический пик при ~59°C. Возможно, он был связан с релаксацией напряжений, возникших в результате взаимодействия между компонентами. На втором нагреве он не наблюдался и, кроме того, он не наблюдался ни при исследовании пленки, изготовленной методом полива (Рисунок 24 Б), ни при исследовании однокомпонентных мембран. В обсуждаемом контексте смесевых мембран этот пример показывает, что в некоторых случаях взаимодействие между компонентами, подвергаемыми электроформованию, приводит к возникновению необычных свойств.

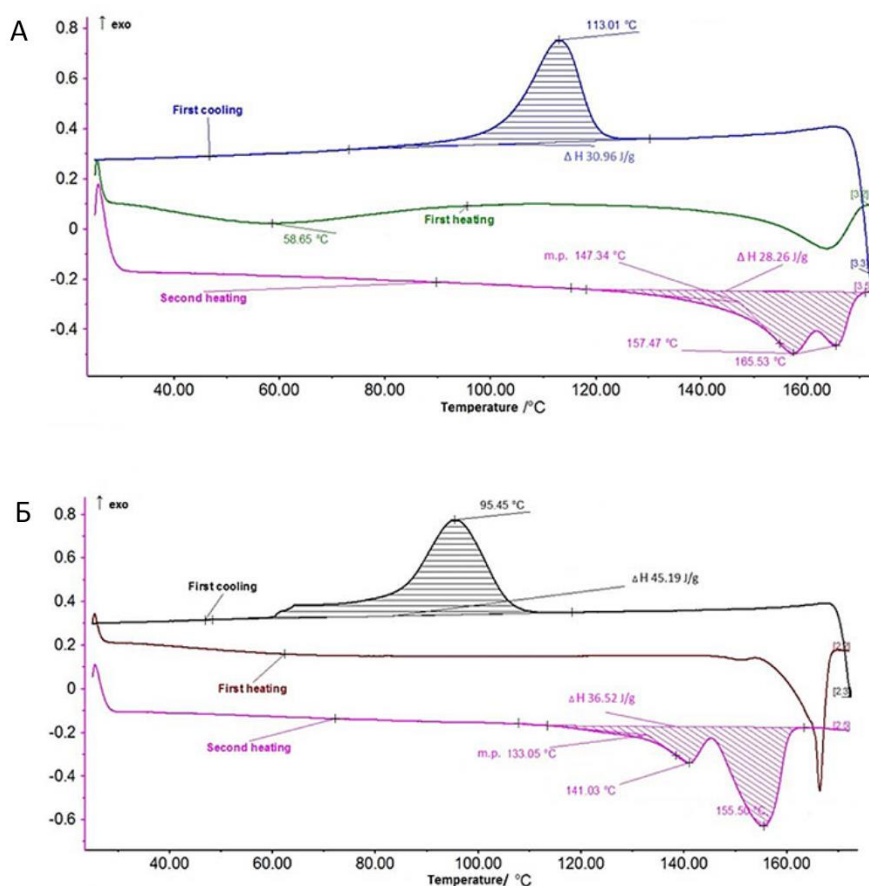


Рисунок 24 – Результаты дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) для электроформованных мембран из смеси ПОБВ и БСА (А) и поливных пленок из той же смеси (Б) [A20].

Совмещение компонент в общем растворителе отлично подходит для внедрения низкомолекулярных веществ в состав волокон, кроме того, с его помощью часто вводят в состав волокон вещества, улучшающие клеточную адгезию, например желатин. Однако внедрение активных белков в состав нерастворимых в воде волокон с помощью этого подхода в общем случае неэффективно [157]. В процессе электроформования белки подвергаются действию денатурирующих органических растворителей, и после этого необратимо теряют свою активность (действие электрического поля представляется менее разрушительным, чем действие органического растворителя). Большинство белков сохраняют свою нативную конформацию и активность только в водной среде, причем в ограниченном диапазоне значений pH и ионной силы [158], [159]. В органических растворителях белки обычно либо нерастворимы, либо сильно меняют свою конформацию, вплоть до перехода в состояние гауссовых клубков [160], [161]. Лишь для единичных белков показано, что они могут выполнять свою каталитическую функцию в органических и водно-органических средах [162-166]. В связи с этим ферменты и другие белки, для которых необходимо сохранение сложной пространственной структуры, обычно не совмещают с полимерами-носителями в органической фазе. Из этого правила есть два исключения. Во-первых, некоторые ферменты, например лизоцим, сохраняют свою активность после контакта с денатурирующим растворителем [167]. Во-вторых, для многих белков и полипептидов, например желатина, показано, что они могут выполнять структурную функцию после контакта с денатурирующим растворителем, и сохранение конформации, по сути, не критично. Особенно удивительно, что в качестве структурных белков могут использоваться даже те, которые в норме структурной функции не выполняют. Например, из альбумина (водорастворимого глобулярного белка) могут быть изготовлены нерастворимые в воде мембраны, которые применимы для создания искусственной сердечной ткани [168]. Именно такой подход к созданию смесевых мембран, основанный на их совмещении в общем растворителе, использован в данной работе в главе 4.

В тех случаях, когда в состав электроформованных волокон необходимо ввести белок, но его контакт с органическим растворителем неприемлем, используют коаксиальное электроформование [169] или электроформование эмульсии [170]. Коротко опишем

каждый из этих вариантов, т.к. они занимают важное место в технологии электроформования в целом.

При использовании коаксиального электроформования используют два раствора (Рисунок 25 А). Обычно это раствор белка в воде или в буфере и раствор биоразлагаемого полимера-носителя в органическом растворителе. Электроформование выполняют с помощью двух коаксиальных игл: по внутренней подают раствор белка, а по внешней – раствор полимера. При таком способе изготовления волокон можно добиться их трубчатой структуры, причем белок будет находиться внутри трубки, а его активность не пострадает от растворения в агрессивной среде. Недостаток этого метода состоит в том, что трубка в процессе изготовления может приобретать дефекты, разрывы, и в целом коаксиальные волокна обычно менее однородны по длине, чем волокна, полученные обычным электроформованием.

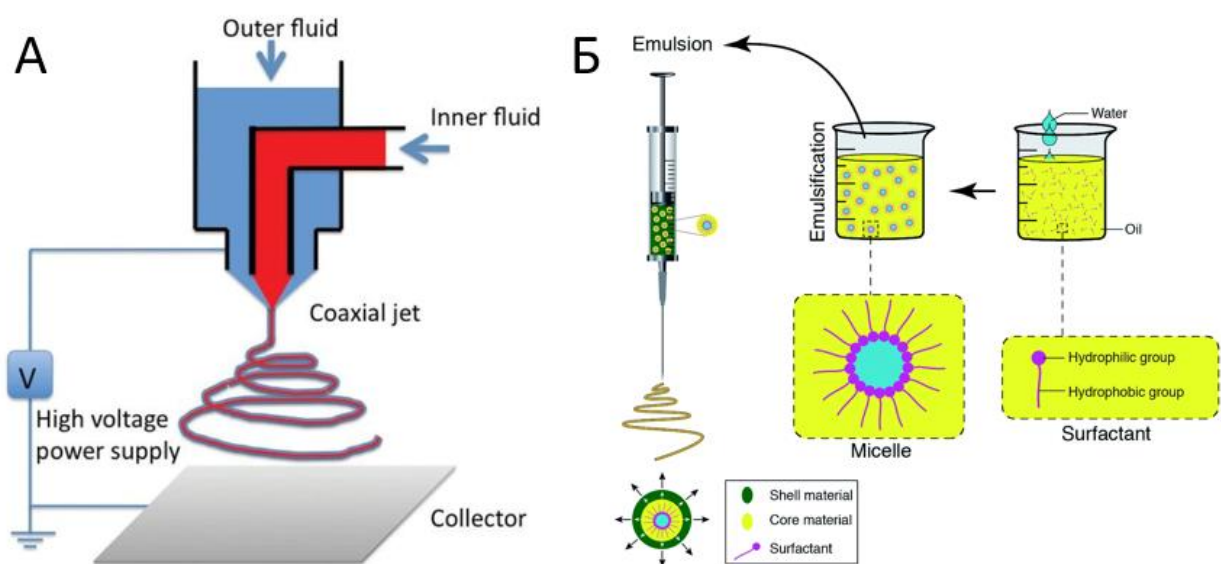


Рисунок 25 – Специфические способы электроформования, которые помогают внедрить белок в состав нерастворимых в воде волокон, минимизируя контакт молекул белка с органической фазой. А – коаксиальное электроформование [169], Б – электроформование эмульсии [170].

При электроформовании эмульсий белок, который необходимо защитить, помещают в обратные мицеллы, находящиеся в органическом растворителе (Рисунок 25 Б). В этот же органический растворитель добавляют полимер-носитель – и проводят электроформование. В процессе электроформования мицеллы защищают белок и поддерживают вокруг него

водное окружение. В результате обычно удается сохранить конформацию и активность белка.

Таким образом, электроформованные волокна могут подвергаться модификации либо путем пост-обработки (адсорбции различных веществ на поверхность, обработки плазмой и т.п.), либо путем вариации состава на этапе их изготовления. Обе эти возможности активно используются для изменения свойств электроформованных волокон и мембран.

### **1.2.3. Использование электроформованных мембран в задачах фильтрации, а также в биологических и химических сенсорах**

Возможности использования электроформованных мембран в регенеративной медицине, которые обсуждались в разделе 1.2.1, иллюстрируют наиболее популярное направление исследований, связанных с электроформованием. В последние годы возникло еще одно направление, которое пока что является относительно новым и не таким популярным. Это использование электроформования для изготовления компонент биологических и химических сенсоров. Его смысл состоит в том, что функциональной компонентой биологического или химического сенсора может быть мембрана или отдельные электроформованные волокна, на которых был сформирован рецепторный слой, т.е. слой молекул, способных селективно улавливать аналит – вещество, которое необходимо обнаружить в пробе. Это применение электроформованных волокон следует рассматривать в контексте лабораторных анализов и, в частности, иммуноферментного анализа (ИФА).

Для многих диагностических и аналитических задач иммуноферментный анализ является стандартом. Классический ИФА имеет множество разновидностей, обычно он требует специализированного оборудования и высокой квалификации лаборантов. Метод ИФА не относится к методам исследования, традиционно используемым в физике полимеров, поэтому будет уместно коротко обсудить его принцип действия и некоторые физические особенности [171], [172].

Допустим, в исследуемом растворе необходимо зарегистрировать белковый аналит. Могут быть получены антитела (АТ), способные специфически связываться с ним с типичной константой диссоциации  $K_d \sim 10^{-10}$ - $10^{-8}$  М (в общем случае диапазон может быть шире). При связывании формируется устойчивый комплекс, стабилизированный большим количеством нековалентных взаимодействий, который на практике считается стабильным

(чтобы его разрушить, необходимы необычные воздействия, например, значительное повышение температуры или ионной силы). Обычно используют не один, а два раствора АТ против анализита, который необходимо зарегистрировать: первый раствор содержит улавливающие АТ, их иммобилизуют на твердом носителе, а второй раствор содержит проявляющие АТ, они конъюгированы с реагентом, который легко обнаружить (Рисунок 26). Например, они могут нести на себе биотин, присутствие которого легко выявить флуоресцентно меченым стрептавидином или же конъюгатами стрептавидина с ферментами: пероксидазой хрена (ПХ) или щелочной фосфатазой (ЩФ). Эти ферменты при добавлении специфических субстратов генерируют оптический сигнал – хемилюминесцентный или колориметрический.

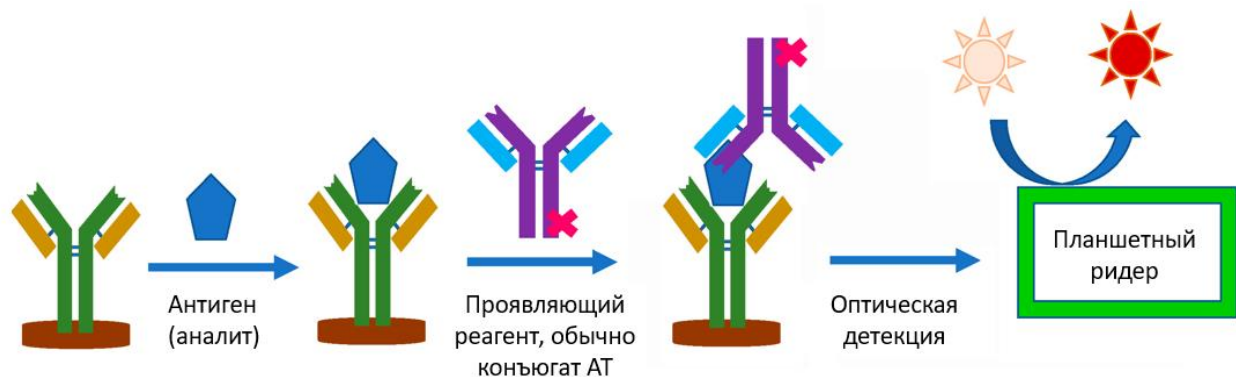


Рисунок 26 – Схема иммуноферментного анализа (ИФА). Показана схема сборки «сэндвича» из улавливающих антител, антигена и проявляющих антител.

В ходе реакций собирается «молекулярный сэндвич» из улавливающих антител, анализита и проявляющих реагентов (их может быть несколько для усиления сигнала), поэтому такие системы часто называют «сэндвич-ИФА». Он собирается на твердом носителе, обычно на доннышке ячейки планшета, предназначенного для считывания оптических сигналов с помощью ридера (планшетного фотометра). Такие планшеты изготавливают из ПС, этот выбор является индустриальным стандартом и отлично подходит для иммобилизации широкого круга белков. Слой молекул антитела называют рецепторным слоем, по аналогии с рецепторным слоем различных биосенсоров. Для того, чтобы избежать неспецифического связывания и ложноположительного срабатывания аналитической системы, между нанесением основных реагентов поверхность блокируют с помощью растворов альбумина, желатина, этаноламина или других блокировочных агентов.

Система, проиллюстрированная на рисунке 26, является типичной, но у нее есть множество вариаций. Например, в некоторых случаях анализом является не произвольный глобулярный белок, а антитела, например, против COVID-19. В этом случае первые два слоя «сэндвича» меняются местами – на твердый носитель наносят антиген, на него пробу, содержащую антитела, а затем проявляют мечеными антителами, полученными из организма другого вида.

Рассмотрим фундаментальные ограничения предела обнаружения, связанные с закономерностями адсорбции и оптической детекции [171]. Обычно улавливающие антитела относятся к классу IgG и представляют собой глобулярные молекулы с гидродинамическим диаметром  $\sim 10$  нм. Внутренняя площадь ячейки планшета, с которой контактирует раствор, составляет  $\sim 1$  см<sup>2</sup>, т.е. на ней можно иммобилизовать  $N_{\max} \sim 10^{11} - 10^{12}$  молекул. Адсорбция анализа обычно описывается изотермой Ленгмюра, и количество занятых сайтов специфической адсорбции антигена может быть оценено по формуле

$$N = N_{\max} \frac{C}{K_d + C}$$

При концентрации белка  $c = 1$  нг/мл и молекулярной массе 100 кДа (молярная концентрация  $C = 10^{-11}$  М) получаем количество молекул анализа, которое может быть связано с рецепторным слоем  $N \sim 6.5 \cdot 10^8$ . При  $c = 1$  пг/мл (это порядок концентрации, который соответствует пределу обнаружения многих коммерчески доступных наборов для ИФА) получим  $N \sim 6.5 \cdot 10^5$ . Эти молекулы анализа оказываются связаны с рецепторным слоем при его взаимодействии с пробой. Затем, после удаления пробы и промывки, они связывают проявляющий реагент и позволяют получить оптический сигнал, который регистрируется детектором. Эти рассуждения подталкивают к тому, что при постоянном значении  $K_d$  (оно определяется взаимодействием между молекулами анализа и рецепторного слоя) предел детекции можно увеличить, если мы увеличиваем количество сайтов специфического связывания анализа ( $N_{\max}$ ). Это может быть достигнуто за счет развитой поверхности носителя, на котором иммобилизован рецепторный слой.

Развитие диагностических систем идет по пути улучшения всех параметров и характеристик – ускорения анализа, увеличения его чувствительности, расширения динамического диапазона, увеличения специфичности, снижения требований к оборудованию и квалификации персонала. Эффективность многих молекулярно-

аналитических систем может быть улучшена за счет использования пористых полимерных носителей. Такие носители (бумага, нитроцеллюлозные мембраны и т. п.) дешевы, и в то же время позволяют эффективно иммобилизовать на развитой поверхности рецепторный слой. Они используются в тест-полосках (lateral flow assay, LFA), в которых проводятся иммуноанализы и генетические анализы, и в устройствах бумажной микрофлюидики. Переход от классического ИФА, в котором реакции проводятся на донышке планшета, к альтернативным системам, можно рассматривать как закономерное эволюционное развитие аналитических систем.

Иммобилизация рецепторного слоя на нетканых пленках и мембранах используется в тест-полосках для латерального проточного иммуноанализа. Это отработанная технология, которая позволяет быстро выполнять иммунологические, молекулярно-генетические, токсикологические и другие виды анализов [173], [174]. Обычно тест-полоска состоит из четырех основных частей: аналитической мембраны, резервуара с проявляющим агентом (например, конъюгатами коллоидного золота), мембраны для нанесения образца и впитывающего элемента.

Особенность тест-полосок состоит в том, что в них проба движется под действием капиллярных сил; пористость и смачиваемость аналитической мембраны обеспечивают движение жидкости по полоске. Ее обычно изготавливают из нитроцеллюлозы, хотя иногда используют также поливинилиденфторид (ПВДФ), нейлон, полисульфон и другие полимеры [174], [175]. Наибольшее распространение получили мембраны из нитроцеллюлозы – их начали использовать в 1970-х годах для разных видов блоттинга, а с 1980-х стали применять в тест-полосках. Их изготавливают методом полива из смеси растворителя и осадителя (органического растворителя и воды, соответственно), соотношение между ними определяет характерный размер пор. После их испарения формируется пористая мембрана; либо в раствор, используемый для ее формирования, либо уже на сухую мембрану обычно добавляют поверхностно активное вещество для улучшения смачиваемости [176]. Иногда мембраны изготавливают на полиэфирной пленке, чтобы не допустить их растрескивания.

Нитроцеллюлозные мембраны для тест-полосок обладают рядом известных достоинств и недостатков [177]. К достоинствам относят низкую себестоимость, высокую способность связывать белки, отличные характеристики смачиваемости, наличие широкого

спектра мембран с разной пористостью, содержанием поверхностно активных добавок и скоростью смачивания. К недостаткам относят вариации свойств от одной партии к другой, сложности хранения (в первую очередь, возрастание хрупкости при хранении), зависимость от влажности. Неудовлетворительные механические свойства нитроцеллюлозных мембран стали одной из причин того, что их стали укреплять дополнительным поддерживающим слоем, либо использовать мембраны из других материалов, например, ПВДФ [176].

Идет активная работа по оптимизации аналитических мембран [173], и одно из направлений этой работы состоит в использовании электроформования при их изготовлении. Электроформованные структуры могут использоваться либо в качестве покрытий для стандартных мембран [178], либо в качестве самостоятельных, свободных мембран [179], хотя количество работ, в которых описаны такие эксперименты, на настоящий момент мало. Если электроформованное покрытие наносят на поверхность нитроцеллюлозной мембраны, то его можно использовать, чтобы замедлить течение пробы вблизи тестовой (аналитической) и контрольной линий и усилить связывание проявляющего агента.

Сочетание гибкости электроспиннинга, возможности формировать материалы с тонкими волокнами и высокой удельной поверхностью (порядка  $\sim 10 \text{ м}^2/\text{г}$  [180], [181]) из полимеров и смесей различного состава позволяет использовать их в качестве элементов биосенсоров. Некоторые работы по иммуноаналитическим системам, выполненным с помощью электроформованных мембран, собраны в таблице 2. В ней указаны только те работы, в которых использована оптическая детекция, т.к. она обычно требует наиболее простого оборудования или, в случае качественных анализов, осуществляется невооруженным глазом. Расширенный вариант этой таблицы, включающий более обширный список биосенсоров, а также работы по химическим сенсорам и работы на смежные темы, приведен в нашей обзорной статье [A33]. Некоторые из перечисленных систем обеспечивают предел обнаружения белковых аналитов на уровне  $\sim 10 \text{ пг/мл}$ , что соответствует коммерчески доступным системам. Кроме того, в некоторых случаях аналитические системы на основе электроформованных мембран позволяют сократить время анализа по сравнению с аналогичными классическими системами.

Многие исследователи утверждают, что электроформованные мембраны как основа для биосенсоров могут иметь преимущества перед плоскими подложками (и в некоторых

случаях это преимущество может быть продемонстрировано экспериментально как улучшение предела детекции или снижение времени анализа). Но при этом неясно, имеют ли электроформованные мембраны в этом контексте какие-то преимущества перед другими пористыми мембранами (экспериментальной проверке этой гипотезы посвящен раздел 6.4). Для сравнения, в воздушных фильтрах преимущества электроформованных мембран известны и подробно обоснованы: они эффективно работают за счет того, что создают малое сопротивление потоку и имеют значительный остаточный электрический заряд.

Таблица 2 – Основные работы, в которых описано использование электроформованных мембран в качестве элементов иммуносенсоров с оптической детекцией. ПО – предел обнаружения, АТ – антитела.

| Аналит                     | Полимер                                                             | Подготовка поверхности  | Рецепторный слой                          | Способ детекции                                                                                                               | Особенности                                                                                        | Ссылка |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Бисфенол А                 | ПКП и фиброин шелка, совмещенные в коаксиальных волокнах            | -                       | АТ                                        | Колориметрическая детекция; проявляющий реагент – конъюгаты золотых НЧ с антителами против бисфенола А                        | ПО of 2 нг/мл (~8.8 нМ)<br>Исполнение в виде LFA                                                   | [182]  |
| АТ мыши (IgG мыши)         | Биотин-содержащий сополимер                                         | Стрептавидин            | Биотинилированные антивидовые (анти-мышь) | АТ<br>сэндвич-ИФА; реагент – конъюгаты АТ с ПХ.                                                                               | ПО 7.5 пМ – хуже, чем у обычного ИФА 0.9 пМ<br>Время нанесения аналита 1 ч вместо 26 ч             | [183]  |
| АТ человека (IgG человека) | Тер-полимер PMBS                                                    | Вакуумная сушка при 65С | Антивидовые (анти-человек)                | АТ<br>сэндвич-ИФА; реагент – конъюгаты АТ с ПХ                                                                                | Оптимальный ПО 0.91 нМ/мл<br>Линейный диапазон 1–100 нМ/мл                                         | [184]  |
| АТ против TSP50            | Сополимер ПЛА и полимера, содержащего группу HC≡C-CH <sub>2</sub> - |                         | Азидированная форма TSP50                 | Колориметрическая детекция; сэндвич-ИФА; реагент – конъюгаты АТ с ПХ                                                          | Для иммобилизации молекул рецепторного слоя использована клик-химия                                | [185]  |
| α-фетопроtein              | ПЛА                                                                 | Обработка NaOH          | АТ, иммобилизованные с помощью EDC/NHS    | Колориметрическая детекция с помощью конъюгатов НЧ золота с АТ или флуоресцентная детекция с помощью флуоресцентно меченых АТ | ПО 10 нг/мл (~0.14 нМ, визуальное обнаружение)<br>ПО 0.17 пг/мл (~2.4 фМ, флуоресцентная детекция) | [151]  |

|                                                             |                   |                                                             |                                        |                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| АТ против ВИЧ                                               | Поликарбонат (ПК) | -                                                           | Антиген ВИЧ gp41                       | Флуоресцентная детекция с помощью флуоресцентно меченых АТ                                            | [186]                                                                                                                                                                                                           |
| Альбумин                                                    | Полистирол (ПС)   | Обработка кислородной плазмой                               | АТ                                     | Флуоресцентная детекция с помощью флуоресцентно меченых АТ                                            | ПО 3.1 мг/мл (~ 48 μМ) [187]<br>Система представляла собой сенсорную мембрану, совмещенную с гидрогелем для культивирования клеток                                                                              |
| α-фетопротеин, раковоэмбриональн<br>ый антиген (СЕА) и VEGF | Полистирол (ПС)   | Обработка в плазме                                          | АТ                                     | Флуоресцентная детекция, непрямая иммунофлуоресценция; проявляющий реагент – флуоресцентно меченые АТ | Оптимальные ПО: α-фетопротеин – 0.10 нг/мл (~ 1.4 пМ), [188]<br>СЕА – 0.09 нг/мл (~ 0.5 пМ),<br>VEGF – 26.19 нг/мл (~ 0.7 пМ),                                                                                  |
| Альбумин                                                    | Полистирол (ПС)   | -                                                           | АТ                                     | Флуоресцентная детекция с помощью флуоресцентно меченых АТ                                            | Динамический диапазон 5–1000 нг/мл (~0.08–15.20 нМ). [189],<br>Время нанесения образца может быть снижено до 5 с за счет вакуумной системы [190]                                                                |
| С-реактивный белок (СРБ)                                    | ПЛА, целлюлозы    | ацетат целлюлозы обрабатывали в парах глутарового альдегида | АТ, иммобилизованные с помощью EDC/NHS | Колориметрическая детекция, сэндвич-ИФА, проявляющий реагент – конъюгаты АТ с ПХ                      | ПО 13 пг/мл (~108 фМ), 53 пг/мл (442 фМ) и 27 пг/мл (228 фМ) [152]<br>соответственно для нановолокон ПЛА, ацетата целлюлозы и контрольных волокон хлопковой ваты. ПО и время анализа ниже, чем при обычном ИФА. |

## **2. Экспериментальное исследование субмикронных волокон, сформированных различными способами**

### **2.1. Материалы и методы**

#### **2.1.1. Пептиды RADA-16-I и RLDL-16-I**

Пептиды RADA-16-I и RLDL-16-I были предоставлены И.П.Удовиченко (Пушинский филиал ИБХ РАН) в лиофилизированном виде. Их разводили в воде, концентрация растворов составляла 1-2 мг/мл.

Особенность экспериментов, описанных в данной работе, связана с химической структурой концевых групп. При синтезе пептидов их концевые группы часто ацетируют [114], [191], однако в данной работе были использованы пептиды с нативными группами  $\text{H}-(\text{ArgAlaAspAla})_4\text{-OH}$  и  $\text{H}-(\text{ArgLeuAspLeu})_4\text{-OH}$ . Их молекулярные массы составляли 1672 Да и 2008 Да соответственно, и это отлично подтверждалось данными масс-спектрометрии.

Для измерений методом ПЭМ раствор разводили водой до концентрации 10-100 мкг/мл. В качестве подложек использовали сетки TedPella, покрытые формваром и углеродом; их обрабатывали в тлеющем разряде с помощью установки Emitech K100X при токе 25-30 мА в течение 45 с. На обработанную поверхность углерода наносили пептид, затем каплю удаляли фильтровальной бумагой и наносили 1-2% раствор ацетата уранила. В нем сетки выдерживали 1-2 минуты, затем промакивали и высушивали. Исследование проводили на электронном микроскопе JEM-1011 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

#### **2.1.2. Метакрилированные белки**

Метакрилированный фиброин шелка и желатин были предоставлены И.В.Бессоновым (кафедра биоинженерии биологического факультета МГУ). Для метакрилирования готовили растворы указанных белков с концентрацией 50 мг/мл в 0.1 М калий-фосфатном буфере раствора (pH 7.2) проводили для растворов. В раствор вносили 1 мл метакрилового ангидрида и проводили реакцию при температуре 50°C и постоянном перемешивании. Время реакции составляло 3 ч для желатина и 1 ч для фиброина шелка. Далее к смеси добавляли 20 мл 0.1 М калий-фосфатного буфера (pH 7.2), смесь остужали и диализовали в течение 3 суток для удаления метакрилового ангидрида. После этого модифицированные белки лиофилизировали и хранили в сухом виде.

Для экспериментов по фотополимеризации готовили растворы метакрилированных белков с концентрацией 10 мг/мл, в качестве растворителя использовали ГФИП или муравьиную кислоту. В эти растворы вносили фотоинициатор, оксид дифенил(2,4,6-триметилбензоил) фосфина. Этот раствор полимеризовали с помощью ультрафиолетовой лампы (диапазон длин волн 200-280 нм, мощность 36 Вт) или с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа (длина волны 405 нм).

### **2.1.3. Крейзинг полимеров в адсорбционно-активной среде**

Образцы полимерных пленок, деформированных по механизму крейзинга в адсорбционно-активной среде (ААС), были предоставлены А.Ю.Ярышевой (химический факультет МГУ). Толщины пленок составляли соответственно 25 мкм, 100 мкм и 90 мкм для ПЭВП, ПКЛ, ПП, соответственно. Растяжение проводили в водно-спиртовой смеси (1:7 по объему) со скоростью 5.4 мм/мин. Размер рабочей области пленки, которая подвергалась растяжению, составлял 20х40 мм. После растяжения пленки закрепляли в кольцевых металлических зажимах и разрезали, чтобы расположенную в зажиме часть пленки перенести под АСМ. Основная часть экспериментов была выполнена с пленками ПЭВП марки «Стамилан» (Голландия) с толщиной 25 мкм. Кроме них, в нескольких экспериментах использовали ПЭВП производства ООО «Полимер Тверь» с толщиной 60 мкм.

### **2.1.4. Атомно-силовая микроскопия**

Измерения методом АСМ проводили в полуконтактном режиме на микроскопах Solver PRO-M, Solver BIO Olympus и Integra Prima (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия). Все они оснащены системой емкостных датчиков, которая обеспечивает позиционирование сканера в плоскости XY с относительной погрешностью не более 1% (по данным паспорта прибора).

В экспериментах с крейзованными полимерами и с метакрилированными белками сканирование проводили как на воздухе, так и в жидкости (микроскопы Solver PRO-M и Solver BIO Olympus, соответственно). Использовали кантилеверы из нитрида кремния PNP-DB (Nanosensors), MSCT-AUHW (Veeco), а также кремниевые кантилеверы NSG01 или NSG10 (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия). Получали изображения, содержащие 256х256 или 512х512 точек, частота сканирования лежала в диапазоне 1-2 Гц.

В экспериментах с пептидом RADA-16-I сканирование проводили только на воздухе (микроскоп Integra Prima), причем использовали сверхострые кантилеверы с радиусом кривизны 1-2 нм [192].

### **2.1.5. Просвечивающая электронная микроскопия**

Измерения морфологии фибрилл RADA-16-I методом ПЭМ проводили на микроскопах JEM-1011 и JEM-1400 (Jeol, Япония) при ускоряющих напряжениях 80 кВ и 120 кВ соответственно. Изображения сохраняли на камеры Orius SC1000W (Gatan Inc., США) и Rio-9 (Gatan Inc., США) соответственно.

Исследуемые образцы (тонкие волокна RADA-16-I) наносили на сетки с углеродным покрытием, которые были предварительно обработаны в тлеющем разряде (установка Emitech K100X, время обработки 45 с) или в плазме (установка Deiner plasma cleaner, время обработки 30 с). Время адсорбции составляло 30-60 с. Затем сетки промакивали фильтровальной бумагой и контрастировали в двух каплях 1% ацетата уранила по 30-45 секунд в каждой. После контрастирования сетки еще раз промакивали и высушивали.

### **2.1.6. Растворы для электроспиннинга**

В экспериментах по электроспиннингу использовали полимеры из следующего списка:

1. Полилактид, ПЛА. Производители: REC, Россия (доля D-изомера 4.5%) и Sigma, США (L-изомер).
2. Поликапролактон, ПКЛ. Торговая марка Полиморфус, производитель: Shenzhen Bright China Industrial, Китай.
3. Поли(оксибутират-со-оксивалерат), ПОБВ. Образец предоставлен А.П.Бонарцевым (биологический факультет МГУ).
4. Полидиоксанон, ПДО. Производитель: VOC Sciences, США.
5. Полипентадекалактон, ППДЛ, предоставлен И.Е.Нифантьевым, химический факультет МГУ.
6. Нейлон-6, Sigma, США
7. Нейлон-11, Sigma, США
8. Бычий сывороточный альбумин, БСА, Панэко, Россия
9. Фиброин шелка, предоставлен А.М.Мойсенович (биологический факультет МГУ)
10. Желатин, Sigma, США
11. Нитроцеллюлоза, НЦ, Biorad, США (в виде пористой мембраны для блоттинга)

Их использовали в чистом виде, либо в виде смесей (они будут подробно описаны ниже). В качестве растворителя обычно использовали 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол

(Пим-Инвест, Россия), кроме того, в некоторых экспериментах с ППДЛ в раствор добавляли 30% хлороформа (Химмед, Россия), в экспериментах с нитроцеллюлозой в качестве растворителя использовали смесь ацетона (Химмед, Россия) и диметилформамида (Химмед, Россия, 8:2 или 7:3 по объему).

#### **2.1.7. Электроспиннинг**

Электроформованные мембраны готовили на установке Nanofiber Electrospinning Unit (Китай). Обычно использовали следующие параметры:

- Концентрация раствора в диапазоне 100-150 г/л
- Напряжение между иглой шприца и коллектором 15-20 кВ
- Расстояние до коллектора 15-20 см
- Скорость подачи раствора 0.5-2 мл/ч
- Потенциал: на игле «+», на коллекторе «0».
- Внутренний диаметр иглы 0.7 мм

Во многих экспериментах между иглой коллектором и устанавливали пластиковую рамку, при этом коллектор мог быть либо плоским, либо точечным (провода, направленная в сторону иглы). В редких случаях использовали систему компенсации заряда встречным потоком изопропилового спирта [193], [194].

#### **2.1.8. Сканирующая электронная микроскопия**

Для некоторых экспериментов на СЭМ образцы покрывали металлом (использовали сплав Au-Pd). Напыление делали на установке для катодного распыления IonCoaterIB-3 (Япония) или на установке для магнетронного распыления Sputter Coater Q150T (Великобритания). Типичная толщина напыления составляла 20 и 10 нм, соответственно.

Измерения методом СЭМ проводили на микроскопах TM3000 (Hitachi, Япония) и Merlin (Zeiss, Германия). При работе на микроскопе TM3000 исследовали только образцы, покрытые металлом, ускоряющее напряжение составляло 15 кВ, изображения содержали 640x480 или 1280x1040 точек. При работе на микроскопе Merlin исследовали как образцы с напылением, так и без него. Для исследования образцов без напыления использовали малый ток ( $I_e \sim 30-90$  пА) и малое ускоряющее напряжение, 1-3 кВ. В общем случае ускоряющее напряжение лежало в диапазоне от 1 до 10 кВ. Изображения содержали от 1024x768 точек до 4096x3072 точек.

## 2.2. Получение субмикронных волокон методом самоорганизации

*Данный раздел основан на статье [A1]. Вклад автора состоял в разработке концепции эксперимента, проведении измерений методами ПЭМ, оптической спектроскопии и некоторых АСМ-измерений, а также в обработке данных.*

В данной работе для исследования особенностей самоорганизации выбраны синтетические пептиды RADA-16-I и RLDL-16-I. Они обладают выраженной тенденцией к формированию  $\beta$ -листов, т.к. в них чередуются сравнительно гидрофобные остатки (аланина или лейцина) и сравнительно гидрофильные остатки аргинина и аспарагиновой кислоты. В результате, если молекула принимает предельно ориентированную конформацию, то одна ее сторона оказывается гидрофобной, а другая гидрофильной, и в полярной среде такие молекулы стремятся агрегировать, чтобы скрыть гидрофобные функциональные группы от контакта с растворителем. Более того, заряженные остатки также создают чередование: положительные заряды на остатках аргинина и отрицательные на остатках аспарагиновой кислоты также чередуются между собой. Некоторые авторы высказывали гипотезы о том, что пептид может существовать в состоянии однослойных  $\beta$ -листов [105], [195]. В данной работе эта гипотеза прошла экспериментальную проверку с использованием АСМ.

Экспериментальные исследования уже в 2005 году показали, что RADA-16-I способен к формированию тонких волокон, а при больших концентрациях он формирует гидрогели [195]. По аналогии с гидрогелями из других похожих по структуре пептидов (например, EAK-16, RAD-16), гидрогели RADA-16-I оказались биосовместимыми, и потому привлекли интерес научного сообщества как перспективный материал для хирургии [108], [109].

На рисунке 27 А, Б представлены АСМ-изображения волокон пептидов RADA-16-I и RLDL-16-I. Они отлично соответствуют аналогичным изображениям, имеющимся в литературе для пептида RADA-16-I [105], [106], [195] и других аналогичных пептидов [114]. Количество волокон в поле зрения закономерно изменялось при вариации концентрации, использованной для нанесения образца на слюду. При нанесении образца на слюду из воды и из буфера (Hepes, 20 mM, pH 7) морфология фибрилл RADA-16-I получалась аналогичная.

Высота волокон над подложкой (рисунок 27 В, Г) принимала значения из распределения с несколькими пиками. Для RADA-16-I удалось наблюдать три явных пика и низкий четвертый, для RLDL-16-I два явных пика и низкий третий. Расстояние

между соседними пиками было близко к ожидаемой толщине бислоя, сформированного двумя  $\beta$ -листами. Для RADA-16-I оно составляло 1.8 нм, для RLDL-16-I – 2.4 нм, и оно оказывалось больше за счет того, что боковые остатки лейцина крупнее, чем боковые остатки аланина. Разница в толщине бислоев, состоящих из молекул RADA-16-I и RLDL-16-I, была подтверждена расчетами, выполненными методом молекулярной динамики (рисунок 28). Это распределение со множеством пиков можно интерпретировать следующим образом: пептиды формируют «элементарные фибриллы», каждая из которых состоит из двух молекулярных слоев, а затем эти элементарные фибриллы могут слипаться друг с другом своими боковыми поверхностями – и при этом формировать более крупные агрегаты.

Первый пик на каждом распределении фибрилл по высотам (рисунок 27 В, Г) соответствовал высоте 1.9 нм, причем для пептида RLDL-16-I он заметно отличался от ожидаемой толщины молекулярного бислоя. Разница может быть связана с тем, что слой молекул, расположенный непосредственно на подложке, более интенсивно с ней взаимодействовал, чем выше расположенные слои, и это взаимодействие влияло на измеряемую высоту. Аналогичная разница наблюдалась в нашей ранней работе с рекомбинантными спидроинами 1F9 и 2E12 [196].

Фибриллярная морфология пептида RADA-16-I была подтверждена данными просвечивающей электронной микроскопии (рисунок 29). Наличие пересечений фибрилл согласуется с предположением о том, что они присутствовали в растворе и затем последовательно адсорбировались на подложку, а не формировались непосредственно на ней. Это наблюдение будет использовано при обсуждении природы монослойных ламелей ниже. Ширина фибрилл составляла 5-6 нм, что отлично соответствует контурной длине молекулы RADA-16-I. В молекулярно-динамических расчетах средняя ширина бислоя составляла  $5.1 \pm 0.1$  нм (рисунок 28 А).

Экспериментальные данные, полученные в данной работе, подтверждают способность RADA-16-I к формированию волокон, а также подтверждают, что строительной единицей этих волокон является пара молекулярных слоев. Каждый слой представляет собой  $\beta$ -лист, однако на основании данных, полученных методами микроскопии, невозможно выбрать между параллельным и антипараллельным вариантом укладки. В то же время молекулярное моделирование показало, что антипараллельная укладка (рисунок 28 А) более стабильна, чем параллельная.

Аналогично, по литературным данным антипараллельная укладка пептидов аланина более выгодна с точки зрения свободной энергии, чем параллельная [111].

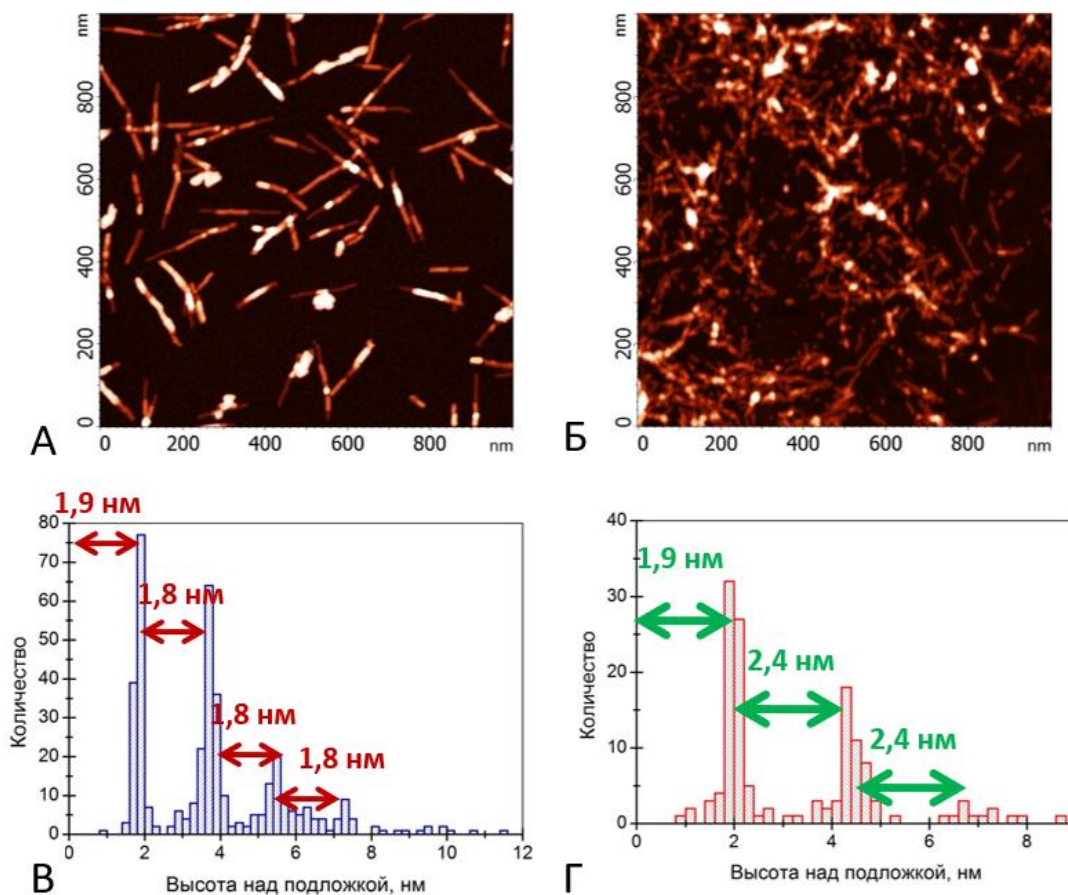


Рисунок 27 – Тонкие волокна (фибриллы) из пептидов RADA-16-I и RLDL-16-I. А и Б – изображения волокон на слюде, полученные с помощью АСМ, В, Г – гистограммы распределение волокон по высотам.

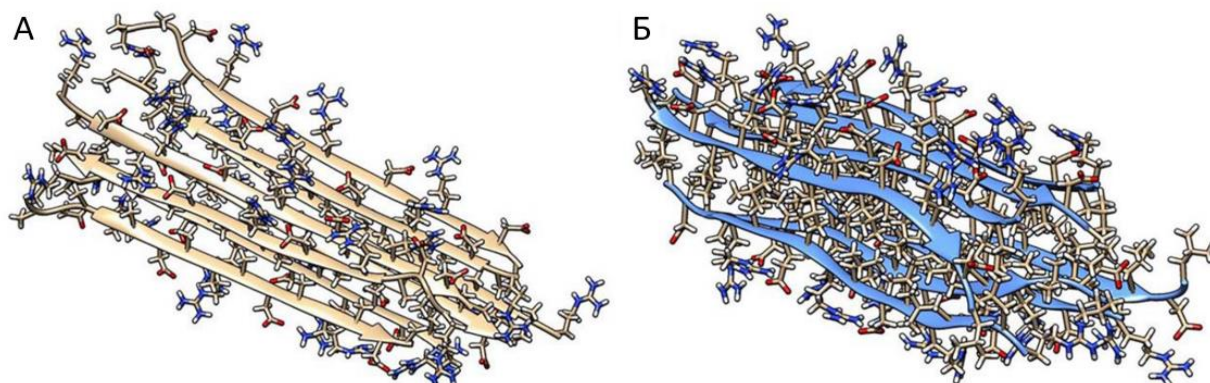


Рисунок 28 – Полноатомные модели агрегатов из восьми молекул пептида RADA-16-I (А) и RLDL-16-I (Б). Молекулы в каждом агрегате формируют бислой из двух антипараллельных  $\beta$ -листов.

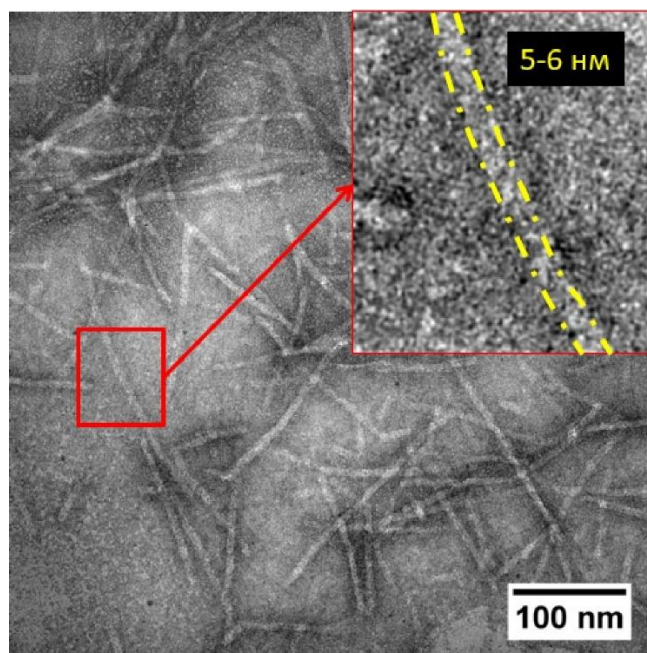


Рисунок 29 – Изображение фибрилл RADA-16-I, полученное методом ПЭМ с негативным контрастированием. Вставка показывает увеличенный фрагмент одной из фибрилл.

В данной работе было показано, что фибриллы RADA-16-I способны связывать амилоид-специфические красители – Конго красный (CR) и тиофлавин Т (ThT). Спектр поглощения Конго красного смещался вправо после добавления пептида в раствор, причем в разностном спектре (синяя кривая на рисунке 30 А) наблюдался характеристический пик вблизи 540 нм. У тиофлавина Т в свободном состоянии практически отсутствовала флуоресценция (возбуждение осуществляли при  $\lambda_{exc}=445$  нм), но после добавления в раствор пептида она появлялась, и спектр эмиссии имел максимум вблизи 482-485 нм (рисунок 30 Б). Выше в разделе 1.1.4 было указано, что оба использованных красителя связываются с  $\beta$ -листами, причем для Конго красного необходимо шесть молекул в составе листа, а для ThT – три. Связывание красителей дополнительно подтверждает, что фибриллы RADA-16-I имеют амилоидоподобную структуру, для которой характерна укладка фрагментов пептидной цепи перпендикулярно оси фибриллы. Несмотря на структурное сходство между фибриллами RADA-16-I и амилоидами, первые подвержены биодegradации и не представляют угрозы для организма, как продемонстрировано во многих исследованиях *in vivo* [108], [197].

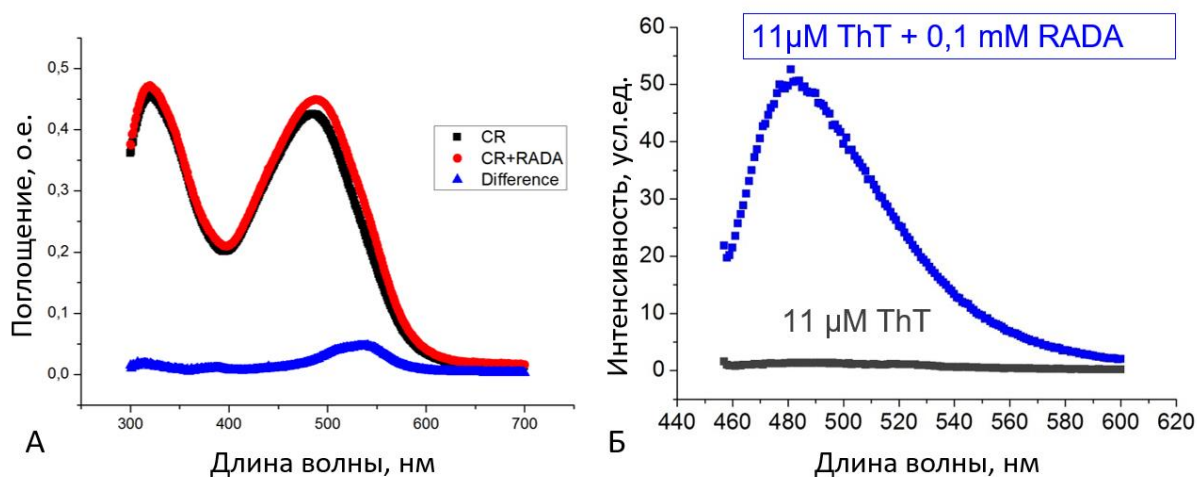


Рисунок 30 – Связывание RADA-16-I с Конго красным (А) и тιοфлавином Т (Б).  
Флуоресценцию ThT измеряли при длине волны возбуждения 445 нм.

В заключение этого раздела обсудим еще одну особенность пептида RADA-16-I и его способности к агрегации. В некоторых статьях упоминалась гипотеза о том, что он может формировать не только двуслойные, но и однослойные (монослойные) структуры [105], [195]. На АСМ-изображениях агрегатов RADA-16-I, полученных из водного раствора (рисунок 27 А), таких структур наблюдать не удалось. Мы выдвинули гипотезу о том, что их можно будет получить, если нарушить устойчивость обычных фибрилл RADA-16-I. Это может быть достигнуто изменением pH. Для проверки этой гипотезы пептид разводили следующим образом. Стоковый раствор пептида с концентрацией ~1 мг/мл готовили в 10 mM KOH или 10 mM HCl и затем разводили тем же растворителем. Нам не удалось получить информативные изображения RADA-16-I при нанесении образца на подложку из щелочного раствора (в качестве подложки использовали графит, слюду, а также слюду, аминированную поли(L-лизин) или 3-аминопропилтриэтоксисиланом). Однако при нанесении кислого раствора на подложку происходила интенсивная адсорбция, и количество адсорбата монотонно зависело от концентрации RADA-16-I (Рисунок 31 А-В). При низкой концентрации ~1 мкг/мл на подложке наблюдались отдельные протяженные структуры, а при увеличении концентрации их количество и протяженность увеличивались вплоть до практически полного заполнения подложки при с~1 мг/мл.

Протяженные структуры, которые наблюдались при низком pH (Рисунок 31), были морфологически сходны с фибриллами, которые наблюдались при нейтральном pH (рисунок 27 А), но имели важные отличия. У структур, которые формировались при кислом pH, отсутствовали пересечения с удвоением высоты, а их высота над подложкой

составляла 0.7-1.1 нм. Это заметно меньше толщины бислоя RADA-16-I (1.8-1.9 нм) и отлично соответствует литературным данным о толщине монослоя пептидов (0.88-1.46 нм [198]).

По данным гель-проникающей хроматографии, при pH 2 большая часть пептида RADA-16 находится в растворе не в виде волокон, а в виде отдельных молекул [106]. Этот вывод был подтвержден нами методом ЯМР-спектроскопии [A1]. Соответственно, для протяженных структур RADA-16-I, которые наблюдаются на слюде, может быть предложена следующая интерпретация. По-видимому, они являются монослойными ламелями, которые формируются при адсорбции отдельных молекул на подложку и последующей самосборке на поверхности. Их рост происходит на подложке, а структура стабилизируется взаимодействием с подложкой (они наблюдались на слюде, а на графите при нанесении аналогичного кислого раствора они формировали неструктурированное покрытие). Латеральный размер такой ламели составляет ~5 нм (Рисунок 31 Г) и хорошо соответствует контурной длине пептида. Аналогичные монослойные ламели описаны для многих других пептидов, включая амилоид-бета пептид A $\beta$ (25-35) [199], GAV-9 [200] и другие. Таким образом, полученные данные подтверждают гипотезу о возможности формирования монослойных агрегатов RADA-16-I, но они, по-видимому, не существуют в растворе, а собираются на слюде.

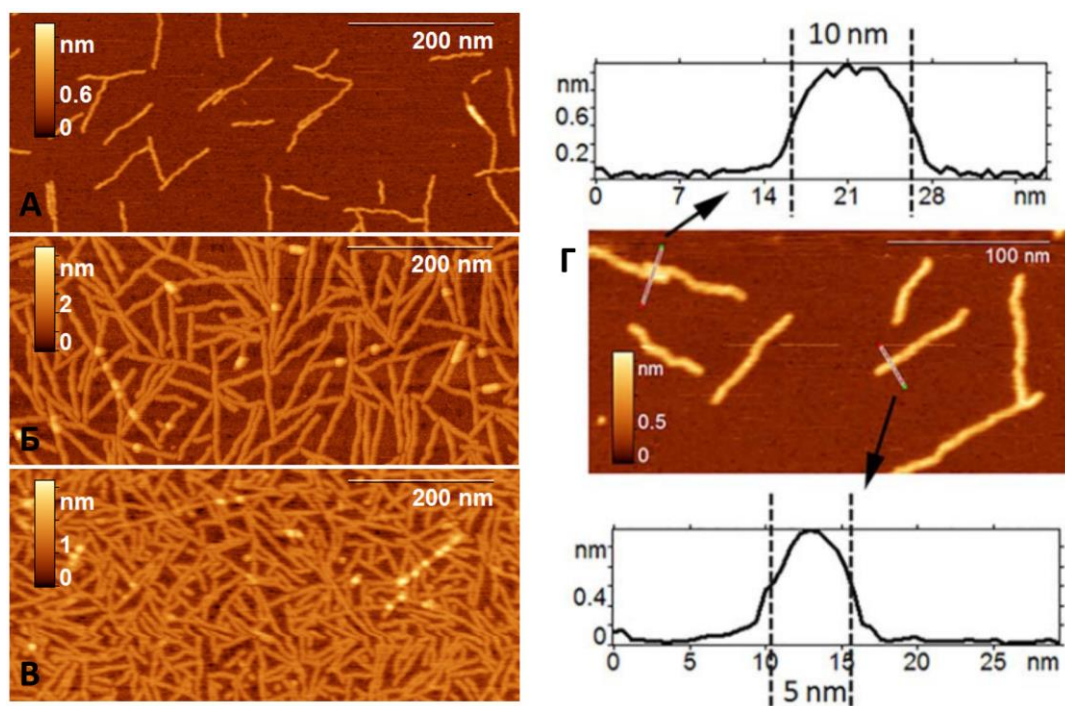


Рисунок 31 – Изображения RADA-16-I на слюде после нанесения раствора с pH~2 (10 mM HCl). Концентрация пептида составляла 1 мкг/мл (А, Г), 50 мкг/мл (Б) и 1 мг/мл (В).

Итак, показано, что пептид RADA-16-I и родственный ему пептид RLDL-16-I формируют нанофибриллы, размеры которых хорошо соответствуют общей модели агрегации амфифильных пептидов, склонных к формированию  $\beta$ -листов. Если рассматривать их в широком контексте субмикронных волокон, то ясно, что возникновение пептидных фибрилл непосредственно определяется особенностями их молекулярной структуры. Самоорганизация как способ формирования тонких волокон применима лишь к ограниченному кругу веществ, молекулярная структура которых обеспечивает возможность их агрегации и упорядочения.

### **2.3. Фотополимеризация метакрилированных белков**

*Данный раздел основан на статьях [A2] и [A3] Вклад автора состоял в выборе условий фотополимеризации, проведении измерений методом АСМ, а также в обработке изображений.*

Эксперименты по фотополимеризации метакрилированных белков выполняли с двумя основными белками – желатином и фиброином шелка. Метакрилированный фиброин (МФ) шелка использовали в чистом виде, а метакрилированный желатин использовали как светочувствительный компонент смеси с фиброином шелка (обычным, неметакрилированным). Из них изготавливали как неупорядоченные структуры (гидрогели, пленки), так и регулярные – именно они представляют интерес в контексте данной работы. Примеры таких структур представлены на рисунке 32. С методической точки зрения они принципиально различаются способом фотополимеризации: надпись микрометрового размера (рисунок 32 А) была сформирована путем засветки раствора лучом КЛСМ, а регулярный микропаттерн – с помощью соответствующего регулярного фотошаблона (рисунок 32 Б, В). Изготовленные таким способом структуры отличаются от неструктурированных губок и пленок из фиброина и его смеси с желатином, которые продемонстрировали свою эффективность во многих биомедицинских экспериментах [201], [202]. Форму и микроструктуру изделий из обычных неметакрилированных белков контролировать значительно сложнее, чем у изделий из светочувствительных производных.

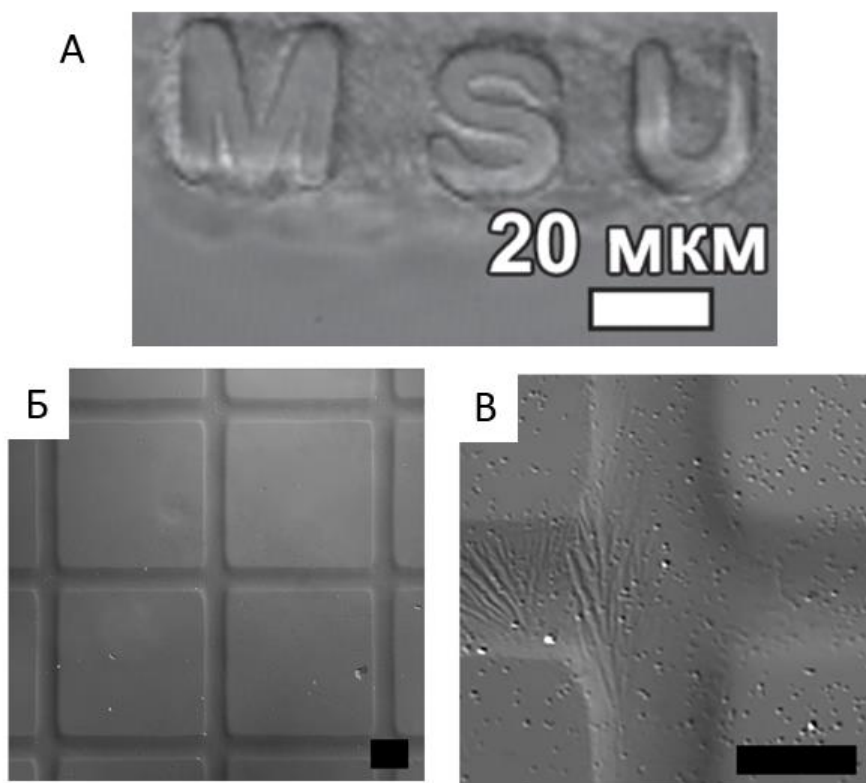


Рисунок 32 – Изображения структур из метакрилированных белков, полученные с помощью оптической микроскопии. А – надпись из смеси МЖ с фиброином (30% МЖ, 70% фиброина), сформированная с помощью КЛСМ. Б, В – изображения упорядоченной структуры из МФ, сформированные путем освещения через фотошаблон. Масштабная метка 50 мкм.

Для улучшения механических свойств регулярных структур и пленок из МФ их обрабатывали не только светом, но и 70% этиловым спиртом. Значение этой обработки проиллюстрировано на рисунке 33. Обработка фиброина шелка в спирте (обычно используют этиловый или метиловый спирт) улучшает его механические характеристики и снижает его растворимость в воде, поэтому многие изделия из фиброина проходят такую обработку после изготовления [203], [204]. В результате нее в молекулах фиброина происходит конформационный переход из состояния случайных клубков в состояние, обогащенное  $\beta$ -листами и  $\beta$ -поворотами. Это показано методами ИК-спектроскопии [205], [206] и спектроскопии кругового дихроизма [207]. В данной работе большинство исследуемых структур (не только регулярные структуры на поверхности, но и макроскопические изделия, пленки и губки) из МФ проходили двойную обработку: их полимеризовали светом и закрепляли спиртом. Предположительно, при этом формировались два типа сшивок: химические (за счет фотополимеризации) и физические, за счет межмолекулярных водородных связей в  $\beta$ -листах. Это схематично показано на рисунке 33 Г. Реологические измерения показали,

что гидрогели из МФ обладают в 5-20 раз более высоким модулем сохранения, чем аналогичные гидрогели из обычного фиброина [A2].

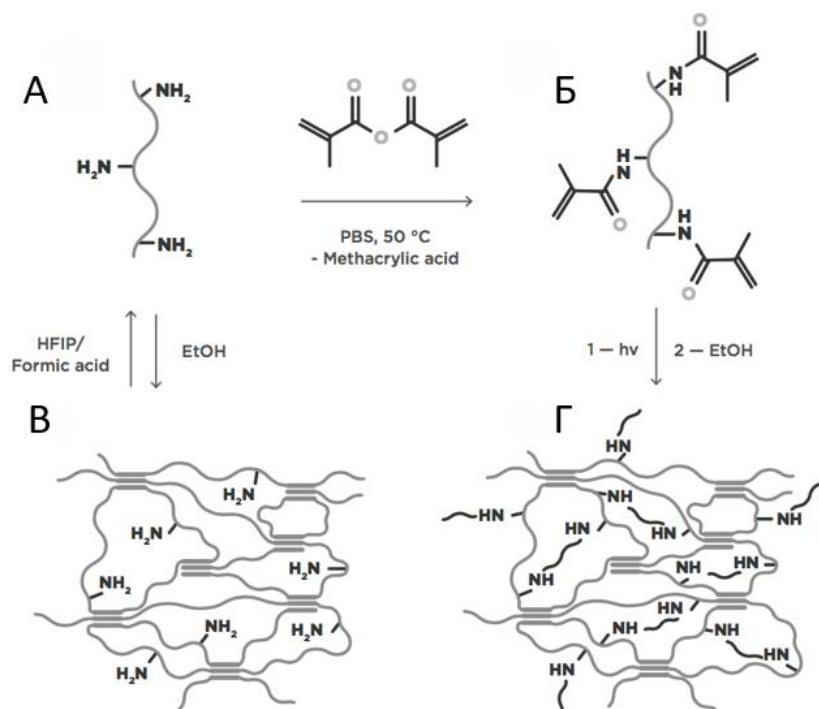


Рисунок 33 – Общая схема реакции метакрирования фиброина и обработки спиртом. А – молекула фиброина шелка, Б – молекула МФ, В – нерастворимая в воде структура из фиброина, Г – нерастворимая в воде структура из МФ.

Для использования полимерных конструкций в трансплантологии важна структура поверхности, с которой контактируют клетки. Для более подробного описания этой структуры, изделия из фотоотверждаемых белков исследовали методом АСМ в жидкости. Изображение одной полоски микропаттерна представлено на рисунке 34, он имел морщинистую поверхность. Ширина у основания составляла 67.5-68 мкм, и это можно рассматривать как латеральный размер минимальной контролируемо созданной структуры (smallest printed feature, SPF). Наша работа [A2] была опубликована в 2019 году, и по параметру SPF не уступала аналогичным работам со светочувствительными биосовместимыми макромономерами [208].

Высота обсуждаемой структуры при измерении в жидкости составляла  $1.03 \pm 0.04$  мкм (рисунок 34), а после высушивания снижалась в 3-5 раз. Формально такая структура является субмикронной только в сухом состоянии, и только вдоль одного измерения, поэтому ее нельзя назвать субмикронным полимерным волокном в строгом смысле. Тем не менее, структуры из фотоотверждаемых белков включены в круг

рассматриваемых объектов, т.к. они позволяют проиллюстрировать некоторые технологические приемы, связанные с получением тонких полимерных волокон, и в целом соответствуют актуальным тенденциям развития науки о биоразлагаемых полимерах и биопечати [116], [208].

Ясно, что фотоотверждение работает только на веществах, имеющих светочувствительные группы, прежде всего, акрилатные. Фотоотверждение похоже на самосборку в том, что его применимость критически зависит от химической структуры обрабатываемого вещества. В связи с этим перейдем к обсуждению более универсальных подходов к получению тонких полимерных волокон – вытяжке и электроформованию.

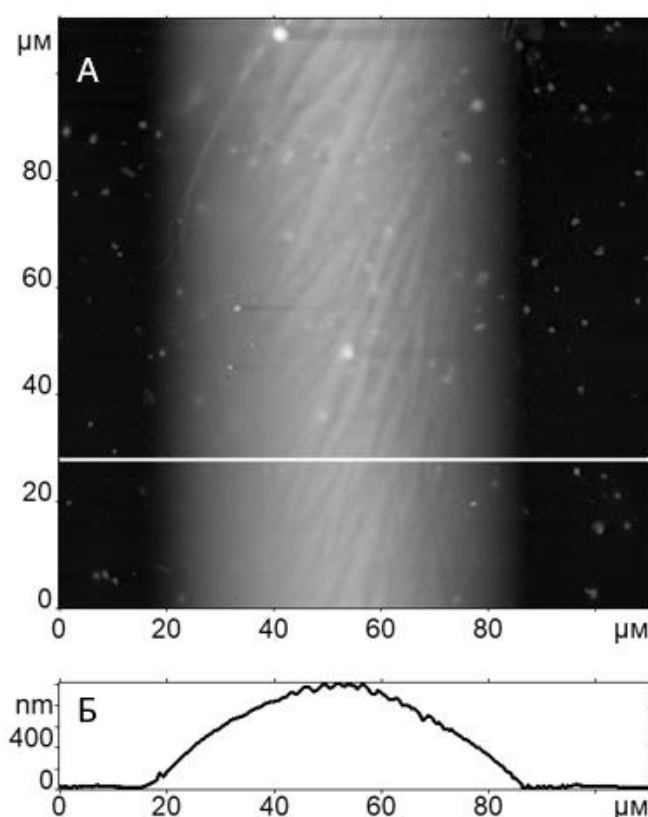


Рисунок 34 – изображение полоски микропаттерна из МФ, полученное с помощью АСМ в жидкости. А – изображение, Б – график сечения вдоль белой горизонтальной линии на А.

#### 2.4. Крейзинг полимеров в адсорбционно-активной среде

*Текст данного раздела основан на статьях [A4]-[A12]. Вклад автора состоит в проведении измерений методом АСМ и обработке изображений, а также в разработке соответствующих методик (сканирование растянутой пленки в жидкости, отслеживание меток на поверхности пленки при усадке пленки).*

Данная часть работы отличается от других частей выбором исследуемых полимеров. Большинство экспериментов, описываемых в работе в целом, выполнены с использованием биоразлагаемых полимеров, однако в данном разделе основным объектом исследования был ПЭВП.

#### 2.4.1. Технические особенности сканирования полимерных пленок на воздухе и в жидкости

Тонкие фибриллы ПЭВП были сформированы методом крейзинга в адсорбционно-активной среде (ААС), причем ААС представляла собой водно-спиртовую смесь. Ниже будет проиллюстрировано, что при удалении ААС морфология поверхности изменяется, и изменяются диаметры фибрилл. Прежде чем обсуждать эти данные, обратимся к некоторым особенностям измерений рельефа поверхности на воздухе и в жидкости.

Исследованная пленка ПЭВП имела ламеллярную структуру, т.е. состояла из стопок ламелей, которые были уложены параллельно друг другу, и их плоскости располагались перпендикулярно плоскости пленки. Изображения поверхности этой пленки, полученные на воздухе и в жидкости, сопоставлены на рисунке 35.

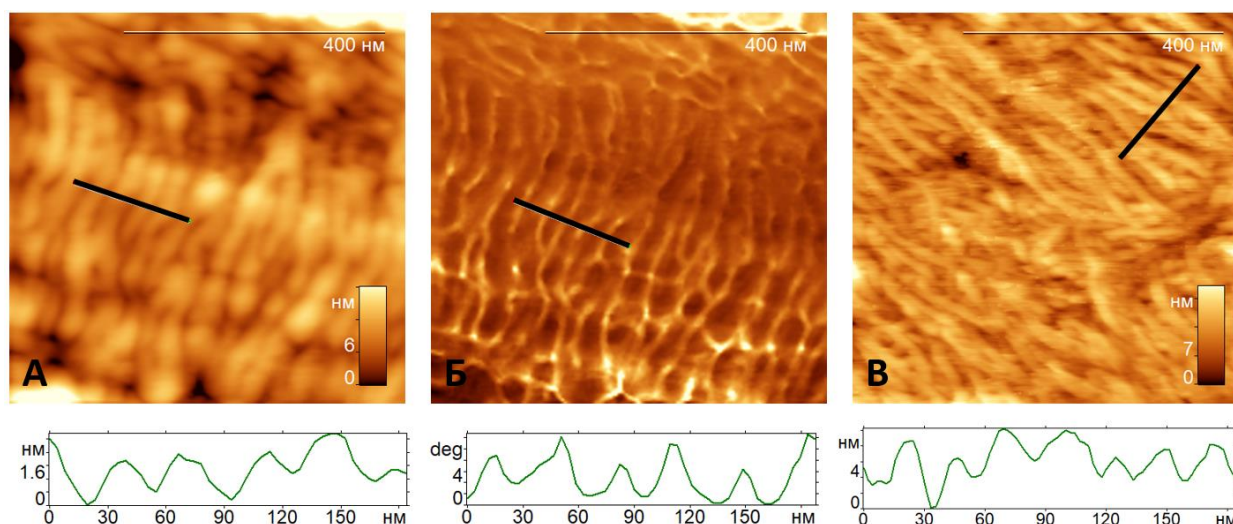


Рисунок 35 – Пленка ПЭВП, использованная в экспериментах по крейзингу. А – изображение рельефа поверхности, полученное при сканировании на воздухе жидкости. Б – соответствующее изображение фазы, полученное при сканировании на воздухе. В – Изображение поверхности, полученное при сканировании в жидкости. В нижней части кадра представлены графики сечений вдоль линий на изображениях.

Такое расположение ламелей в англоязычной литературе называют «edge-on». Если речь идет о пленке, сформированной методом полива, то плоскости ламелей могут располагаться под различными углами к плоскости пленки, и они могут не быть перпендикулярны друг другу. В этом случае период, измеряемый на поверхности, зависит от угла наклона плоскости ламелей. Однако если пленка была сформирована

методом экструзии с раздувом, и в процессе кристаллизации было создано выделенное направление, то можно ожидать, что указанные плоскости почти перпендикулярны плоскости пленки – и в этом случае измеряемый на поверхности период является разумной оценкой большого периода полимера.

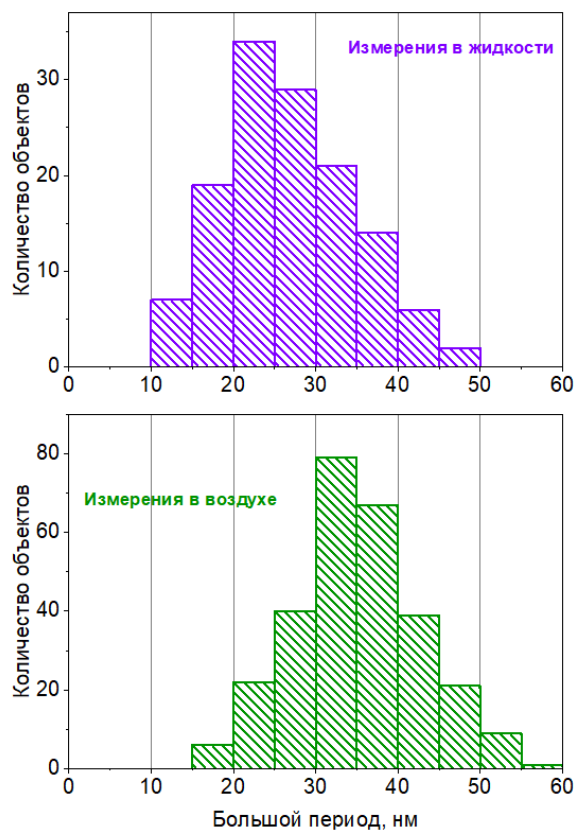


Рисунок 36 – Сравнение большого периода ПЭВП, измеряемого на воздухе и в жидкости.

Его можно вычислить по изображениям рельефа (рисунок 35 А, В) или по фазовым изображениям (рисунок 35 Б). При измерениях периодичности на воздухе в одну выборку объединяли значения, полученные и на изображениях рельефа, и на изображениях фазы. В жидкости фазовые изображения не получали, т.к. при сканировании в жидкости добротность кантилевера  $Q \sim 1-10$  мала – и фазовый контраст сравнительно низкий (кроме того, в жидкости обычно сканировали в контактном режиме). Результаты измерения периода представлены на рисунке 36. Большой период, измеренный на поверхности пленки, на воздухе составляет  $L_{AFM\ air} = 35 \pm 8$  нм, а в жидкости  $L_{AFM\ liq} = 27 \pm 8$  нм. Причем значение, полученное в жидкости, хорошо согласуется с результатами измерения методом малоугловой дифракции  $L = 25$  нм [A4]. Разница между  $L_{AFM\ air}$  и  $L_{AFM\ liq}$ , по-видимому, определяется влиянием капиллярной силы, которая искажает значение  $L_{AFM\ air}$ . Она приводила к тому, что ламели

расплющивались, и в некоторых случаях близко расположенные ламели сливались в одну целую, а расстояние от ее высшей точки до соседних ламелей ошибочно принималось за оценку большого периода. Капиллярную силу можно оценить по формуле [209], [210]

$$F_{cap} \approx 4\pi R\sigma \cdot \cos\vartheta$$

где  $R$  – радиус кривизны кантилевера,  $\sigma$  – коэффициент поверхностного натяжения жидкости, а  $\vartheta$  – краевой угол смачивания, который считается близким для материала кантилевера и для поверхности образца. Используя  $R = 10$  нм,  $\sigma = 72$  мН/м,  $\vartheta = 60^\circ$ , получаем  $F_{cap} = 4.3$  нН, что по меркам поверхности является заметной силой (обычно при сканировании в контактном режиме сила упругости в балке имеет порядок  $\sim 1$  нН). Аналогичная зависимость рельефа поверхности, измеренного методом АСМ, от среды сканирования описана в работе [211] – в ней также наблюдали разницу в рельефе ПЭВП при сканировании в воздухе и в жидкости.

При сканировании на воздухе данные о периоде, измеренные по изображениям рельефа, и фазовым изображениям, отлично совпадали. Согласно классической модели, описывающей динамику кантилевера вблизи поверхности, фаза колебаний  $\varphi$  связана с диссипацией энергии  $E_{diss}$  [212]:

$$E_{diss} = \frac{kA^2\omega_0}{2Q} \left[ \frac{A_0}{A} \sin\varphi - 1 \right]$$

В этой формуле  $k$ ,  $Q$  и  $\omega_0$  – это соответственно жесткость, добротность и резонансная частота кантилевера, а  $A_0$  и  $A$  – амплитуда свободных колебаний и рабочая амплитуда соответственно. Обсуждаемые величины  $A$ ,  $E_{diss}$  и  $\varphi$  при сканировании изменяются от одной точки к другой. Можно ввести в рассмотрение их вариации  $\delta A$ ,  $\delta E$  и  $\delta\varphi$ , причем вариация амплитуды колебаний  $\delta A$  связана с ошибкой обратной связи, которая в свою очередь зависит от изменений рельефа  $\frac{\partial H}{\partial x}$ :  $\delta A \sim \delta\left(\frac{\partial H}{\partial x}\right)$  [213]. Далее, если рассматривать диссипацию энергии, отнесенную к площади контакта между иглой и образцом  $E_{diss} = \varepsilon S$  и ввести вариации соответствующих величин  $\delta\varepsilon$  и  $\delta S$ , то можно показать, что между вариацией фазы  $\delta\varphi$ , локальной диссипацией энергии  $\delta\varepsilon$ , вариацией контактной площадки  $\delta S$  и особенностями рельефа  $\delta\left(\frac{\partial H}{\partial x}\right)$  существует линейная связь вида

$$\delta\varphi = \gamma\delta\varepsilon + \alpha\delta\left(\frac{\partial H}{\partial x}\right) + \beta\delta S$$

В контексте обсуждаемых изображений ПЭВП эта формула важна только потому, что она иллюстрирует тесную взаимосвязь между фазовым изображением и изображением рельефа (рисунок 35 А, Б). В некоторых случаях фазовые изображения частично кристаллических полимеров могут быть более удобными для обработки, чем изображения рельефа, за счет контраста между аморфной и кристаллической компонентами [214]. При этом фазовые изображения менее объективны, чем изображения рельефа, т.к. они очень сильно зависят от выбранного значения рабочей амплитуды (при сканировании в режимах «притяжения» и «отталкивания» фазовые изображения оказываются радикально разными). В целом, в данной работе (в результатах, полученных при сканировании на воздухе, описанных в разделе 2.4.3) их получали исключительно как иллюстративные, а обработку проводили по изображениям рельефа.

Разница между значениями большого периода, измеренными по результатам сканирования на воздухе и в жидкости, гипотетически могла бы объясняться технической ошибкой, связанной с калибровкой микроскопа. Результаты, описываемые в данном разделе, были получены с помощью микроскопа, в котором реализовано сканирование образцом, а не кантилевером. При переходе от сканирования на воздухе к сканированию в жидкости заменяли держатель кантилевера – вместо обычного воздушного держателя устанавливали призму, которая необходима, чтобы сначала ввести луч лазера в жидкость, а затем вывести его назад, в сторону детектора. Эти два держателя имеют разную высоту, и при одной и той же деформации пьезотрубки обеспечивают разное смещение кантилевера в плоскости ХУ. Чтобы учесть эту разницу, при сканировании на воздухе и в жидкости использовали калибровочные профили, созданные независимо с использованием одной и той же калибровочной решетки. Оказалось, что разница калибровочных коэффициентов и разница полей зрения, доступных для исследования на воздухе и в жидкости, составляет ~14%. Использование разных независимо сделанных калибровок для сканирования на воздухе и в жидкости позволило минимизировать погрешность калибровки.

Чтобы проиллюстрировать влияние условий съемки на изображения с точки зрения капиллярной силы, был проведен дополнительный эксперимент. Пленку ПЭВП сканировали сначала на воздухе, а затем в жидкости, причем выбирали строго одну и ту же область, и использовали один кантилевер (рисунок 37). В этом эксперименте использовали не тот ПЭВП, который использовали в большинстве экспериментов, а аналогичный, но более толстый – это был ламеллярный ПЭВП от другого

производителя, с толщиной 60 мкм, а не 25 мкм. При исследовании на воздухе (рисунок 37 А) видно, что поверхность состоит из выступающих объектов с шириной  $66 \pm 20$  нм (по-видимому, это не индивидуальные ламели, а их стопки). При сканировании в жидкости (рисунок 37 Б) видны более мелкие поверхностные структуры, и их ширина составляет  $45 \pm 20$  нм. Профили одного из выступов, измеренные на воздухе и в жидкости, сопоставлены на рисунке 37 В. Наиболее вероятное объяснение разницы состоит в том, что при сканировании в жидкости отсутствует капиллярная сила, а при сканировании на воздухе она дополнительно прижимает кончик иглы кантилевера к поверхности и способствует деформации образца. Это отлично соответствует литературным данным о сканировании ПЭ на воздухе и в жидкости [211].

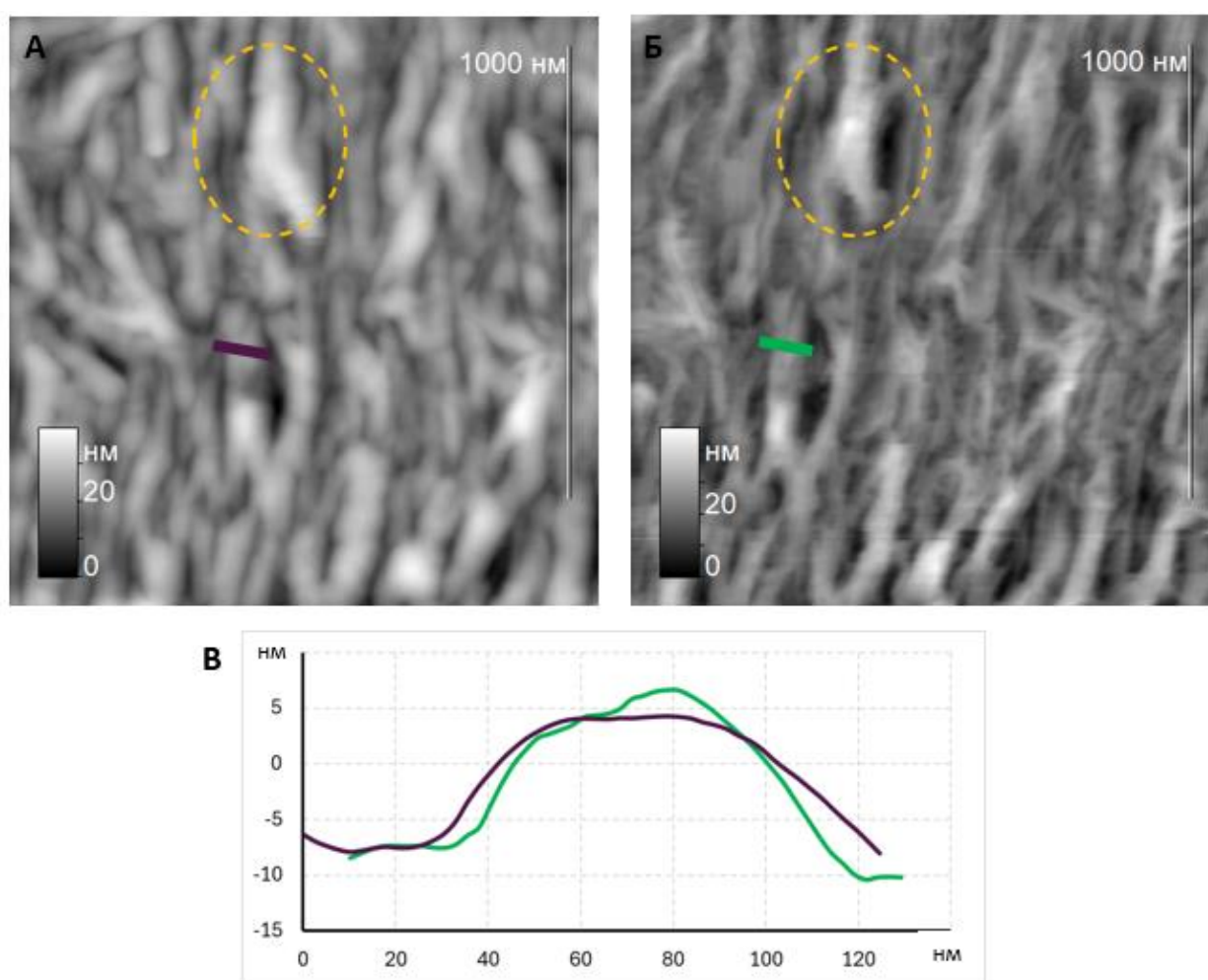


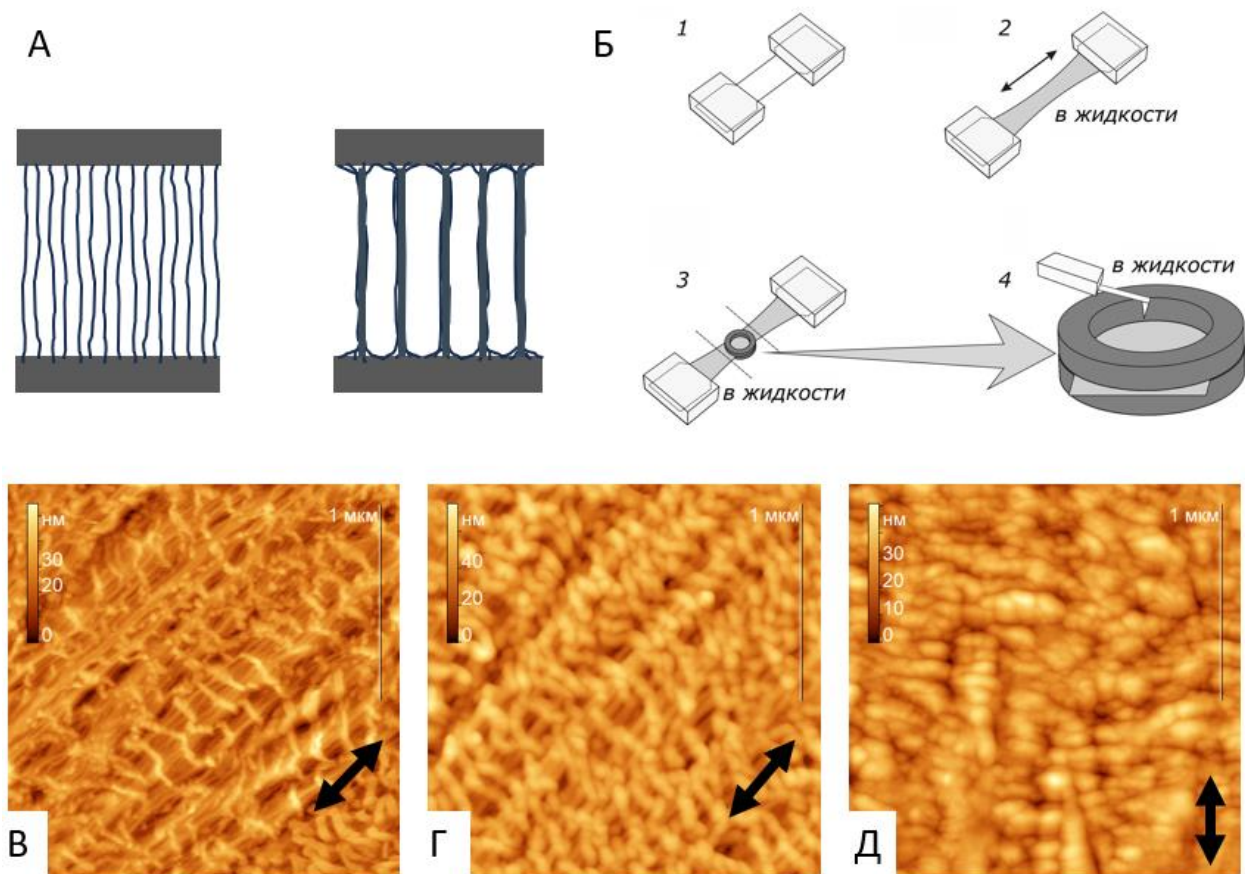
Рисунок 37 – Поверхность пленки ПЭВП, ось экструзии горизонтальна. А – сканирование на воздухе, Б – сканирование в жидкости, В – графики сечений вдоль линий на А и Б. Изображения получены одним и тем же кантилевером, желтым овалом выделена характерная область для удобства сопоставления.

Таким образом, результаты измерений рельефа поверхности пленок ПЭВП методом АСМ зависят от того, проводятся ли измерения на воздухе или в жидкости.

Структура крейзов сама по себе зависит от того, в какой среде находится образец. Поэтому измерения структуры крейзованных полимеров проводили именно в жидкости.

#### **2.4.2. Методика визуализации поверхности полимеров, деформированных по механизму крейзинга**

Визуализация микроструктуры полимера, деформированного по механизму крейзинга, является нетривиальной задачей. Это связано с двумя факторами. Во-первых, крейзованный полимер, как и любой деформированный образец, склонен усаживаться при удалении нагрузки. Во-вторых, если мы говорим о крейзинге в адсорбционно-активной среде, то при ее удалении фибриллы коллапсируют (Рисунок 38 А), и поэтому измерения нативной структуры можно выполнить только в среде (либо необходимо стабилизировать эту структуру специальными процедурами, например нагревом). Для преодоления этих сложностей нами была предложена следующая процедура (Рисунок 38 Б). Образец, растянутый в ААС (в водно-спиртовой смеси), закрепляли в кольцевом зажиме, который предотвращал усадку. Его разрезали, чтобы зажим с фрагментом пленки можно было перенести от растяжного устройства к микроскопу. Перенос осуществляли, не вынимая образец из жидкости, и сканирование также проводили в жидкости. В результате получали изображения поверхности, на которых видны ламели, ориентированные перпендикулярно оси растяжения, и фибриллы, ориентированные преимущественно вдоль нее (Рисунок 38 В). В такой фибриллярно-пористой структуре расстояние между осями фибрилл составляло 15-35 нм. Мы обращали внимание именно на расстояние между осями фибрилл, а не на их ширину на половине высоты, т.к. это расстояние менее чувствительно к радиусу кривизны кантилевера и параметрам сканирования, чем ширина фибриллы или размер поры. Наблюдаемая фибриллярно-пористая структура была в целом аналогична той, которая характерна для пленок Celgard из ПП [24], [215].



Измерения в  
жидкости в зажиме

Измерения на  
воздухе в зажиме

Измерения на воздухе без  
зажима

Рисунок 38 – Визуализация структуры крейзованного полимера. А – схема коллапса фибрилл при удалении ААС. Б – схема визуализации крейзованных полимеров с помощью АСМ. В – изображение поверхности ПЭВП, растянутого на 200% по механизму крейзинга в ААС, полученное в ААС. Г – изображение поверхности ПЭВП, растянутого на 200% по механизму крейзинга в ААС, полученное на воздухе. Д – изображение поверхности крейзованного ПЭВП после удаления механической нагрузки.

Изображения поверхности крейзованных полимеров, получаемые в жидкости, слабо зависели от выбора режима сканирования – в контактном и в полуконтактном режиме они получались схожими, и для упрощения эксперимента большинство изображений получали в контактном режиме. В центральной части кольцевого зажима обычно размещали поддерживающую пластину, которая уменьшала вибрации пленки. В некоторых случаях дрейф образца в плоскости или дрейф кантилевера (спонтанное изменение отклонения во времени) искажали изображения. С одной стороны, эти сложности типичны для измерений методом АСМ в жидкости, с другой стороны они были особенно явными в данной системе из-за того, что пленка находится под нагрузкой, и если она закреплена в зажиме недостаточно плотно, то напряжения в ней

медленно релаксируют – и это проявляется на изображениях как дрейф. Тем не менее, в данной системе жидкость и зажим необходимы для визуализации нативной структуры поверхности. Чтобы проиллюстрировать это, были получены изображения образцов ПЭВП, деформированных по механизму крейзинга, путем сканирования на воздухе (после высушивания образца), а также после освобождения пленки из зажима (Рисунок 38 Г и Д, соответственно). Если освободить крейзованную пленку из зажима и дать ей усесть, то морфология резко изменится – фибриллы станут практически невидимы. На смену фибриллярно-пористой структуре придет гранулярная, ее особенности будут описаны ниже в разделе 2.4.3.

После удаления ААС общая картина фибриллярно-пористой структуры сохранилась, но на количественном уровне она изменилась. После высушивания образца расстояние между осями фибрилл возрастало с 15-35 нм до 30-80 нм. В этих экспериментах для сканирования на воздухе и в жидкости использовали одни и те же кантилеверы, поэтому наблюдаемая разница не могла быть объяснена износом острия. Можно выделить две наиболее вероятные причины увеличения наблюдаемого расстояния между фибриллами. Во-первых, при переходе из ААС к сканированию на воздухе возникала капиллярная сила, которая увеличивает силу взаимодействия между кантилевером и образцом. Можно предположить, что эта дополнительная сила приводила к деформации поверхности и расширению как фибрилл, так и ламелей. Для пленок из ПЭ такое явление описано в работах [211], [216]. Во-вторых, задолго до получения изображений фибриллярно-пористой структуры методом АСМ, была показана ее тенденция к коллапсу при удалении ААС [10], [217], и наблюдаемое увеличение расстояния между соседними фибриллами может быть объяснено этой тенденцией. Сравнить влияние этих двух факторов на морфологию полимера сложно, и поэтому в большинстве работ по исследованию крейзинга нами была использована именно методика съемки в среде под нагрузкой.

Съемка в жидкости необходима для визуализации нативной структуры крейзов, но она не является достаточным условием их возникновения. Можно растягивать ПЭВП на воздухе (без ААС и соответственно без крейзинга) и затем проводить исследование на воздухе или в жидкости. Изображения поверхности, получаемые АСМ, в этом случае в целом аналогичны изображениям крейзованного полимера, но фибриллизация происходит неоднородно – при растяжении на воздухе кроме фибриллярно-пористых участков на пленке наблюдаются сплошные участки сдвиговой деформации [218]. На макроскопическом уровне растяжение на воздухе не сопровождается развитием

пористости (рисунок 4 во введении иллюстрирует это как данными о проникновении красителя в пленку, так и количественными измерениями). Если ПЭВП, растянутый на воздухе, поместить в ААС и исследовать с помощью АСМ, то такое исследование позволит получить более точное изображение поверхности, чем при сканировании на воздухе, но не обеспечит структуры, которая возникает при делокализованном крейзинге.

Описанная выше методика визуализации поверхности крейзованных полимеров может произвести впечатление очень специализированной. Тем не менее, она была использована для различных полимеров, для которых удалось реализовать крейзинг в ААС: ПП и ПКЛ (рисунок 39). Как отмечено выше, при работе с полимерными пленками, растянутыми по механизму крейзинга, измерения необходимо проводить в ААС. Это связано с влиянием двух факторов – возможными структурными перестройками, которые происходят в полимере при удалении среды, и влиянием условий съемки.

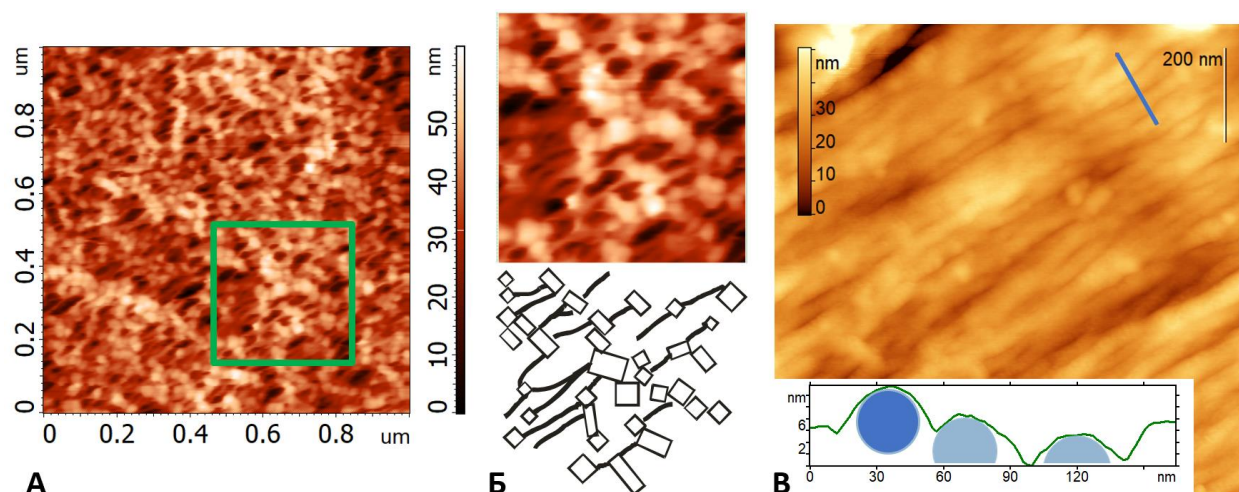


Рисунок 39 – Изображения поверхности образцов ПП и ПКЛ, деформированных по механизму крейзинга в ААС. А – поверхность ПП, растянутого на 300%, Б – увеличенный фрагмент изображения А и соответствующая ему схема ламелей и фибрилл, В – поверхность ПКЛ, растянутого на 80%. Показан график сечения вдоль линии поперек направления вытяжки, на нем схематично показаны тонкие фибриллы ПКЛ.

На рисунке 39 А показан сферолитный ПП после отжига, деформированный в ААС на 300%. Расстояние между соседними фибриллами составляло  $23 \pm 5$  нм, а характерный размер ламелей был значительно меньше, чем у ПЭВП, описанного выше. Ламели (или их фрагменты) выглядели на изображении как зерна, соединенные фибриллами, как показано на рисунке 39 Б. Для ПКЛ (рисунок 39 В) после вытяжки до 80% наблюдалась фибриллярная структура с характерным расстоянием между соседними фибриллами,

равным  $25 \pm 12$  нм. Оба описанных образца были пористыми, причем пористость развивалась только при вытяжке в ААС, но не при вытяжке на воздухе. Таким образом, методика визуализации крейзованных пленок, предложенная для ПЭВП, была использована и для других полимеров – это подтверждает ее ценность для исследования крейзинга.

#### **2.4.3. Усадка полимера, растянутого по механизму крейзинга**

В предыдущем разделе было показано, что если освободить из зажима растянутую пленку из ПЭВП, то она сжимается (претерпевает усадку), и при этом рельеф ее поверхности радикально меняется. Для детального описания процесса усадки нами был использован необычный подход – на поверхность были нанесены метки, и с помощью АСМ были исследованы несколько областей сначала под нагрузкой, а затем тех же самых областей после усадки. Изображения литографической метки до и после усадки показаны на рисунке 40 А и Б (в эксперименте были использованы три такие метки). Эта метка была сделана сравнительно жестким кантилевером NSG30 (типичная жесткость 30 Н/м) методом силовой литографии в контактном режиме. Она представляла собой круг с диаметром 20 мкм, а также восемь отрезков, формирующих четыре угла. Метка была расположена вблизи точки, оставленной маркером, и поэтому ее можно было находить после различных манипуляций, например замены кантилевера или усадки образца. После усадки круг сжался так, что его размер вдоль оси усадки стал 16 мкм. Изображение на рисунке 40 А получено при степени вытяжки  $\varepsilon=200\%$ , а после усадки степень вытяжки составляла  $\varepsilon'=140\%$  (рисунок 40 Б).

Отметки, сделанные маркером на пленке, и литографические метки позволили с высокой точностью выбирать поля зрения для исследования. Обычно при подводе кантилевера к образцу точка подвода выбирается случайно; для исследования оказывается доступна та область поверхности, которая оказывается в пределах поля зрения сканера (в данной работе  $100 \times 100$  мкм<sup>2</sup>). Эта область составляет  $\sim 0.03\%$  от площади пленки, доступной для измерения, т.к. в пределах кольцевого зажима, удерживающего пленку, для исследования доступна область, приблизительно соответствующая кругу с диаметром 2 см. При этом нас интересует область с размером  $\sim 1 \times 1$  мкм<sup>2</sup>, и случайным образом найти ее практически невозможно. Зато при использовании меток и аккуратном позиционировании области интереса относительно них, это становится возможным. Например, изображения на рисунке 40 В, Г показывают один и тот же участок поверхности до и после усадки, причем они были получены с

шагом сканирования  $\sim 3.9$  нм, что приемлемо для ламелей и пучков фибрилл, сформировавшихся после удаления ААС. Для наглядности все АСМ-изображения, представленные на рисунке 40, обработаны с помощью фильтрации сплайном, а также у них оптимизирована цветовая палитра.

Метки на этих изображениях позволяют проследить за некоторыми заметными элементами рельефа и убедиться, что изображения действительно соответствуют одному и тому же участку. Видно, что ламели, которые были отделены друг от друга волокнами (пучками фибрилл), после усадки оказываются расположены вплотную друг к другу т.е. фибриллы между ними становятся неразличимы на АСМ-изображениях. Расстояние между локальными максимумами, измеренными на ламелях, практически не изменяется: оно составляло  $107 \pm 38$  нм до усадки и  $110 \pm 35$  нм после нее. Этот результат может показаться странным, ведь после усадки эта величина должна была бы уменьшиться. Особенность состоит в том, что после усадки некоторые пары близко расположенных ламелей оказываются неразрешимы (ни на изображениях рельефа, ни на фазовых изображениях). Они сливаются в более крупные «блоки», и поэтому расстояние между соседними максимумами почти не изменяется.

Увеличение ширины выступов на поверхности пленки было охарактеризовано количественно по графикам сечений (рисунок 40 Д, Е), проведенным вдоль направления вытяжки. До усадки средняя ширина выступа (ламели) составляла  $d_1 = 34 \pm 6$  нм. После усадки ламели превратились в более крупные объекты с размером  $d_2 = 50 \pm 12$  нм (при расчете этой величины из выборки исключали те ламели, которые прижались к соседним и стали неразрешимы). В данном случае усадка реализуется путем изменения пространственной организации фибрилл: по-видимому, они компактизуются и стягиваются к ближайшим ламелям. Это изменение схематично проиллюстрировано в нижней части рисунка 40 Д. Оно соответствует качественному интуитивному представлению о том, что фибриллы представляют собой подвижную структуру, которая меняет свою конформацию и фактически отвечает за усадку. Их подвижность проявляется в коагуляции (коллапсе) при удалении ААС, а также в изменении конформации после снятия нагрузки.

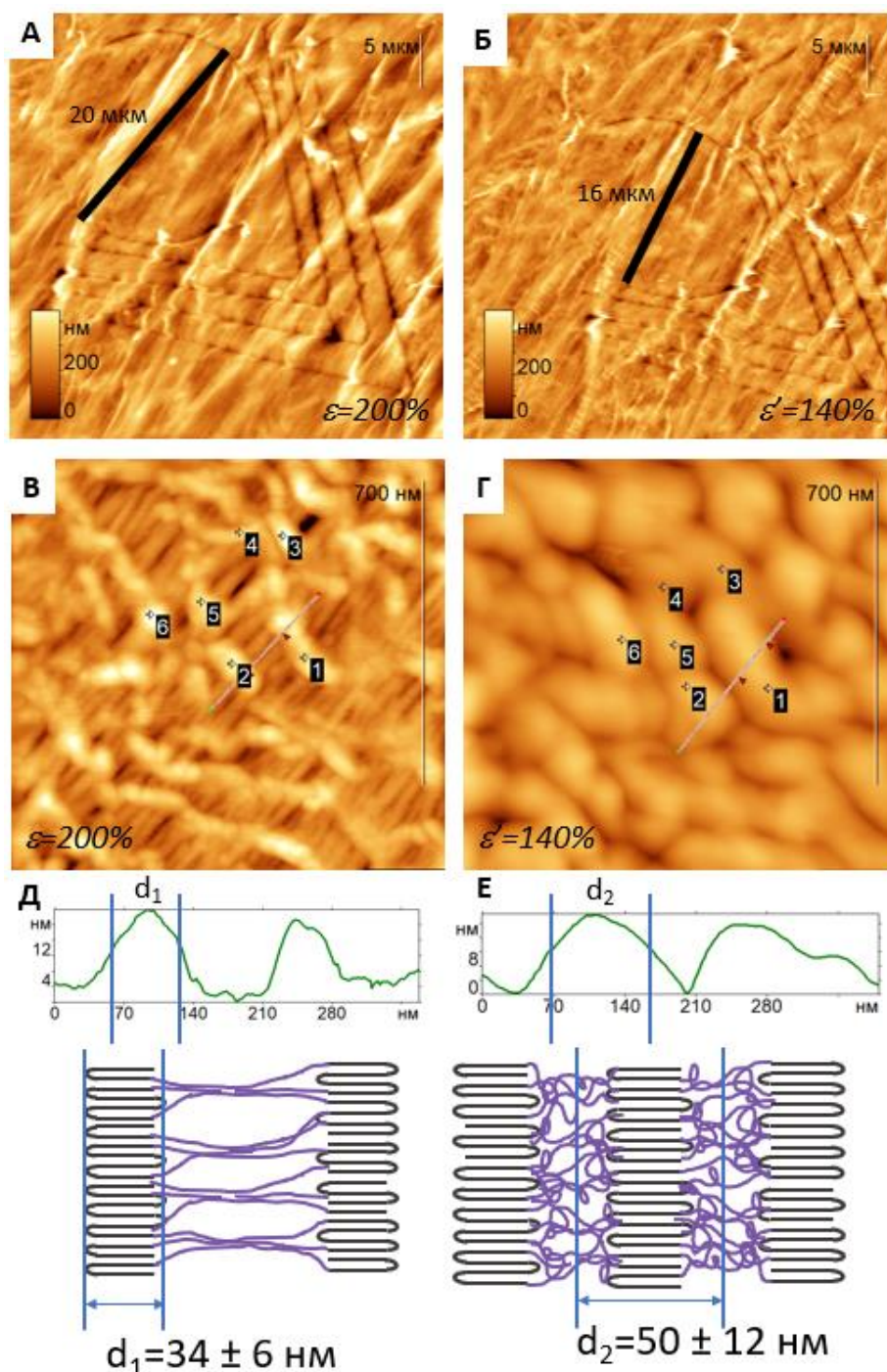


Рисунок 40 – Исследование усадки крейзованного ПЭВП с помощью АСМ. А и Б – изображения поверхности ПЭВП до и после усадки, показана метка, сделанная с помощью литографии. В, Г – изображения ПЭВП до и после усадки, иллюстрирующие смещение и укрупнение ламелей, а также исчезновение фибрилл. Д, Е – графики сечений вдоль линий на В и Г соответственно и схемы структуры.

Можно было бы предположить, что наблюдаемое увеличение от  $d_1$  до  $d_2$  связано с тем, что измерения были выполнены разными кантилеверами. Чтобы избежать такого эффекта, эксперимент проводили следующим образом: одно и то же интересное нас

поле зрения находили и сканировали разными кантилеверами, и затем выбирали наилучшее изображение (Рисунок 41). К счастью, при многократном сканировании поверхности в полуконтактном режиме не наблюдалось изменений рельефа (ни при многократной визуализации одного и того же поля зрения, ни при исследовании некоторого поля зрения и последующем переключении на исследование большей области). В отличие от контактного режима с жесткими кантилеверами, использованными для литографии (рисунок 40 А, Б), сканирование в полуконтактном режиме можно было выполнять многократно. И если возникали сомнения в том, что изображения получены достаточно острым кантилевером (Рисунок 41 А), можно было получить изображение этого же участка повторно, но уже другим кантилевером (Рисунок 41 Б). Сравнение графиков сечений вдоль одной и той же линии показывает, что ширина ламелей, выступающих над уровнем фибриллы, различается на 7-14 нм (Рисунок 41 В). Эти эксперименты иллюстрируют известную проблему АСМ – значительную зависимость детализации изображений от кантилевера, т.к. даже в пределах одной коробки кантилеверы могут различаться по радиусу кривизны.

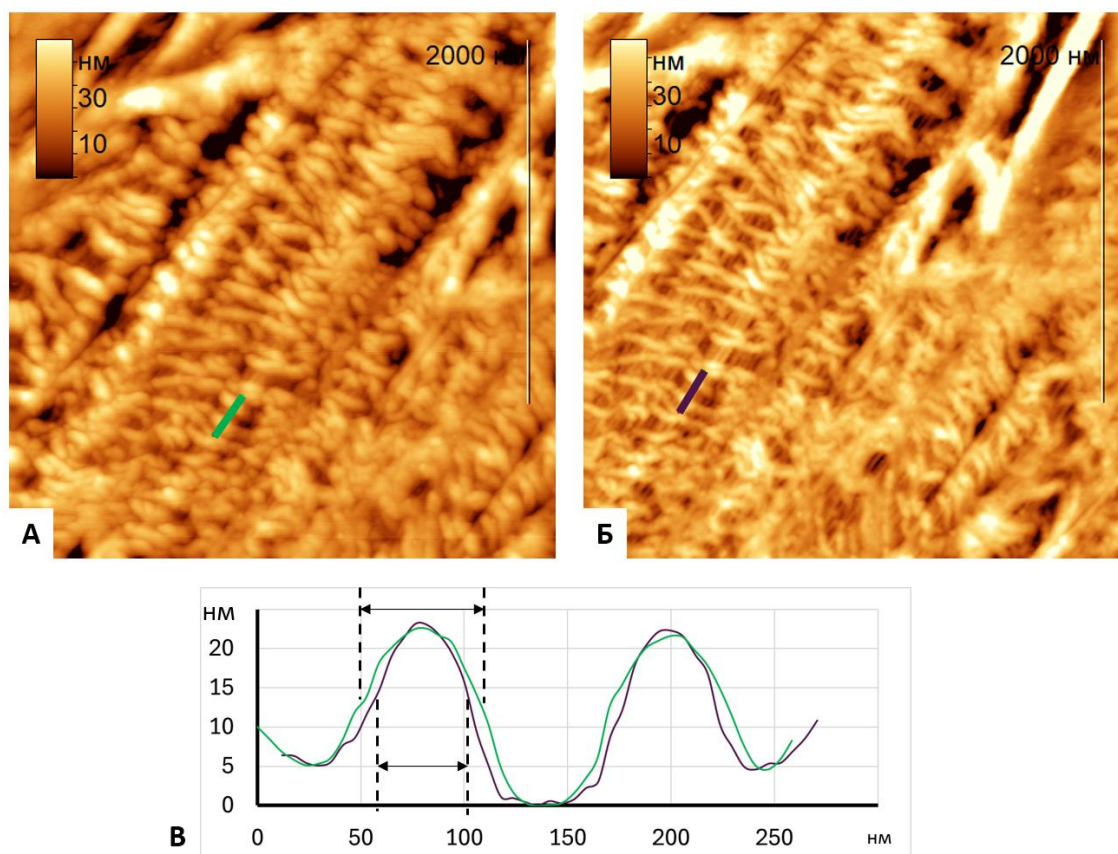


Рисунок 41 – Иллюстрация влияния кантилевера на детализацию АСМ-изображений поверхности крейзованного ПЭВП. А – изображение, полученное сравнительно тупым кантилевером, Б – изображение, полученное сравнительно острым кантилевером, В – сравнение графиков сечений вдоль линий на кадрах А и Б.

Таким образом, усадка крейзованного ПЭВП происходит путем компактизации (сжатия, усадки) фибрилл и сближения соединенных ими ламелей. При этом на поверхности возникают структуры, представляющие собой укрупненные, уширенные ламели – уширение происходит за счет того, что ламель становится неотличима от связанного с ней материала, который в напряженном состоянии был фибриллизирован, а кроме того, некоторые близко расположенные ламели становятся вовсе неразрешимы.

Итак, в данном разделе описано формирование субмикронных волокон из ПЭВП, ПП и ПКЛ с помощью крейзинга в ААС. Для определения структуры полимерных пленок, деформированных по этому механизму, предложены две методики визуализации поверхности – исследование растянутой пленки в зажиме непосредственно в ААС и исследование одного и того же участка поверхности до и после усадки.

Если рассматривать описываемые эксперименты в широком контексте формирования субмикронных волокон, то крейзинг представляется перспективным, но специализированным методом. Он может быть реализован для широкого круга полимеров, но требует, во-первых, выбора подходящей ААС [219], которая обеспечит развитие пористости при деформации, и во-вторых, закрепления структуры с помощью отжига [220]. В связи с этим целесообразно перейти к последнему методу формирования тонких волокон, который представляется наиболее гибким и универсальным и который занимает центральное место в данной работе.

## **2.5. Электроформованные мембраны из различных полимеров**

*Текст данного раздела основан на статьях [A13]-[A16]. Личный вклад автора состоял в разработке концепции экспериментов, их координации и научном руководстве, оптимизации условий электроформования, получении СЭМ-изображений некоторых полимеров.*

В данной работе метод электроформования был использован для изготовления отдельных волокон и мембран из различных полимеров, а именно (рисунки 42 и 43):

- полиэфиров (полилактида, ПЛА, поли(ε-капролактона), ПКЛ, поли(оксибутирата-со-оксивалерата), ПОБВ, полидиоксанона, ПДО, поли(ω-пентадекалактона), ППДЛ)
- нитроцеллюлозы
- нейлонов (нейлона-6 и нейлона-11)
- белков (фиброина, желатина, альбумина)

- полимер-белковых смесей: ПЛА с БСА, ПЛА с желатином, ПОБВ с БСА (смеси будут описаны ниже, в главе 4).

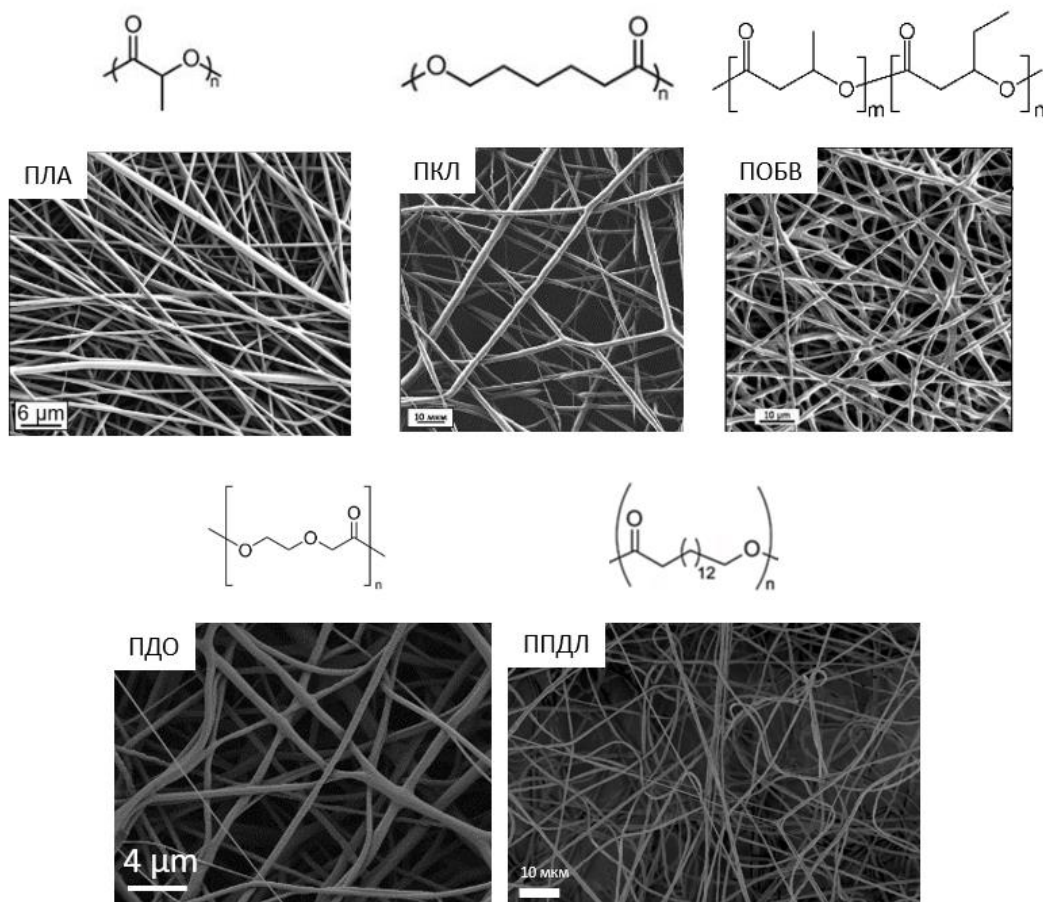


Рисунок 42 – Химические формулы полиэфиров, использованных в работе, и СЭМ-изображения электроформованных мембран из них.

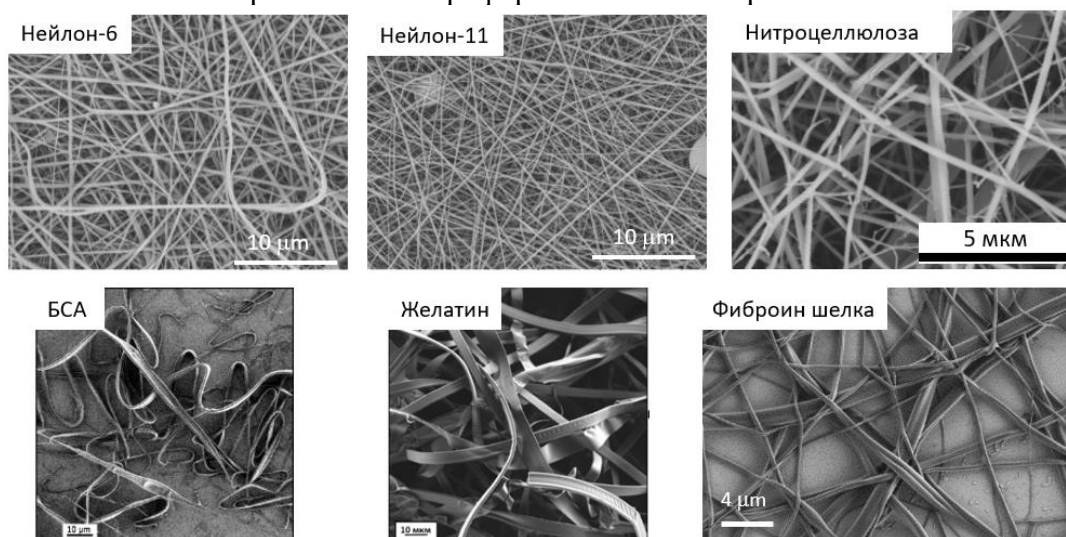


Рисунок 43 – Электроформованные мембраны и волокна из нейлонов, нитроцеллюлозы и белков (БСА, желатина и фиброина шелка).

В большинстве экспериментальных систем в качестве растворителя использовали 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол (ГФИП), но в некоторых случаях прибегали к использованию двухкомпонентных растворителей, например, в работе с нитроцеллюлозой использовали смесь ацетона и диметилформамида (7:3 или 8:2 по объему), а в работе с ППДЛ использовали смесь ГФИП с хлороформом (7:3 по объему). Для всех перечисленных систем были измерены диаметры волокон.

Для формирования очень тонких слоев волокон выбирали малое время напыления, порядка 1-5 с. Такой прием использовали для формирования тонкого слоя волокон на фольге [A16], либо на стекле. В последнем случае покровные стекла размещали на коллекторе и включали напыление, чтобы они покрылись волокнами. В таких экспериментах покровные стекла использовали чистыми, либо для улучшения адгезии наносили на них тонкий слой эпоксидного клея.

Для получения свободно стоящих пленок использовали подход, при котором мембрана формируется на отверстии в диэлектрическом листе [194]. С двух сторон от листа располагали два шприца – один с раствором полимера, а второй с инертным растворителем (в нашем случае – с изопропанолом), который используется для нейтрализации электростатического заряда. Напряжение прикладывали между иглами двух шприцев. При использовании этой схемы расстояние между ними составляло 30-35 см, диэлектрический лист был изготовлен из оргстекла или полипропилена, диаметр отверстия составлял 60-80 мм. Мембрану, сформированную таким способом, можно было использовать как свободно стоящую, либо перенести на подложку, например, на стекло со слоем клея.

Особенность экспериментов по визуализации электроформованных мембран состояла в том, что их часто исследовали методом СЭМ без напыления металла. Это достигалось за счет малого ускоряющего напряжения ( $U \sim 1-5$  кВ) и малого тока ( $I_e \sim 30-70$  пА). Впоследствии возможность проведения измерений методом СЭМ без напыления металла оказалась необходимой в экспериментах по корреляционной микроскопии.

Прокомментируем некоторые особенности волокон, сформированных из различных полимеров. Электроформованные структуры из ПЛА являются наиболее типичными, характерными и удобными для исследования, т.к. при вариации условий в широких пределах сохраняется возможность получения волокон с относительно небольшим количеством дефектов. Было проведено электроформование ПЛА из серии растворов в ГФИП с различной концентрацией, чтобы проследить за взаимосвязью концентрации раствора и морфологии (рисунок 44). При малой концентрации

наблюдается морфология «бусины на нити», которая ранее была описана для многих экспериментальных систем (она обсуждалась в литературном обзоре в разделе 1.1.3). В наших экспериментах бусины были округлыми при концентрациях 1.5% и 3%, вытянутыми при 4.5%, и исчезали при 6%. На качественном уровне формирование бусин можно объяснить недостаточностью электростатической силы, которая растягивает струю полимерного раствора. Действительно, струя в процессе электроспиннинга становится тоньше за счет того, что ее растягивает сила отталкивания между близко расположенными заряженными участками. Если эта сила недостаточна, то в некоторых местах волокно формируется менее эффективно – и мы видим капли. Их количество снижается при добавлении в раствор носителей заряда (например, солей), а также увеличении напряжения [79].

При высоких концентрациях раствора ПЛА в ГФИП (11% или 12%) мы видим не только волокна круглого сечения, но и ленты. Аналогичная зависимость морфологии мембраны от концентрации полимера описана для ПЛА, растворенного в ДМФА и ацетоне [221].

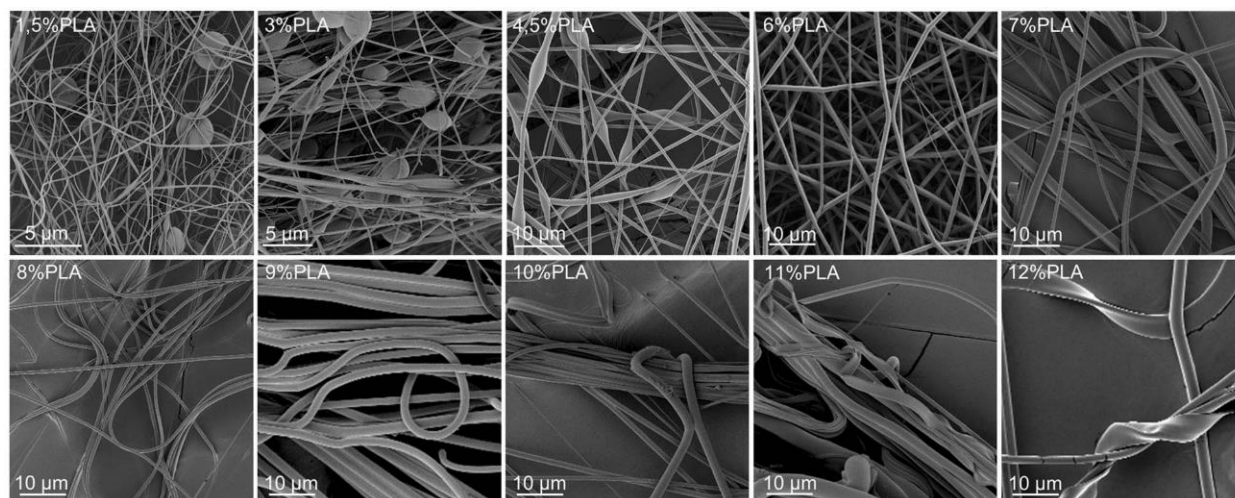


Рисунок 44 – Зависимость морфологии электроформованных волокон ПЛА от концентрации раствора, использованного при электроспиннинге.

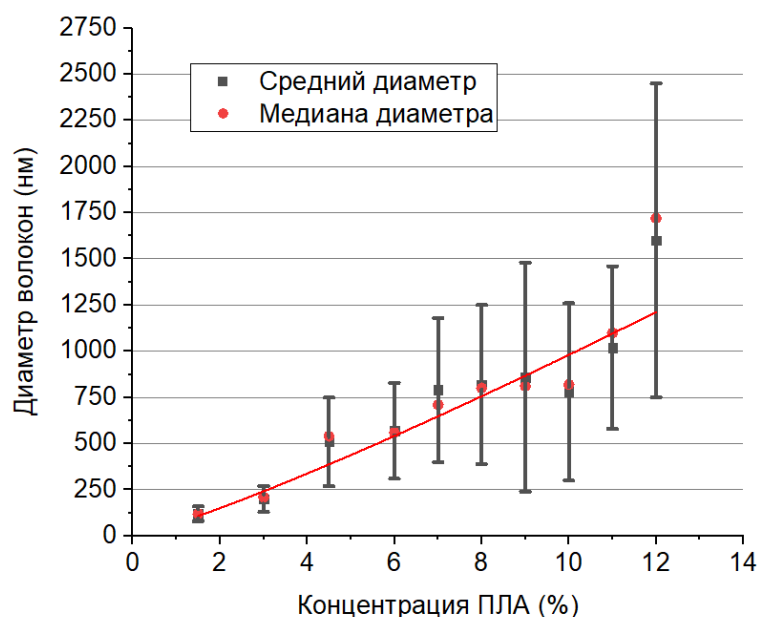


Рисунок 45 – Зависимость диаметра электроформованных волокон ПЛА от концентрации раствора, использованного при электроспиннинге. Красные точки показывают медианные значения, серые квадраты – средние значения, планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению. Красная линия показывает аппроксимацию данных (медианных значений) функцией вида  $y=b \cdot x^c$ .

Диаметр волокон при увеличении концентрации раствора практически монотонно увеличивается (рисунок 45). На рисунке красной кривой показана аппроксимация медианных значений кривой  $y=b \cdot x^c$ . На основании литературных данных можно ожидать значения  $c \sim 2-2.5$  [84], однако реально получалось  $c=1.2 \pm 0.1$ , т.е. в этом эксперименте диаметр волокон почти линейно зависел от концентрации ПЛА.

Схлопывание волокон в ленты, которое наблюдалось для ПЛА при концентрациях 11-12%, было характерно для белков (рисунок 43), причем в более широком диапазоне концентраций. Например, БСА формировал ленты (не сплошные, а фрагментированные) уже при концентрации 6-7%, а волокон цилиндрического сечения практически не наблюдалось. Явная тенденция белков к формированию лент, которую мы наблюдали в экспериментах, отлично соответствует литературным данным [91], [168].

Фундаментальная причина формирования лент – это потеря устойчивости струи полимерного раствора под действием сжимающей силы [74]. При движении струи к коллектору из ее поверхностного слоя сравнительно быстро испаряется растворитель, и формируется система «жесткое покрытие на податливом основании», или, другими словами, струя разделяется на сердечник и оболочку. Под действием сжимающей силы поверхностного натяжения эта система может потерять устойчивость аналогично тому,

как при сжатии стержня с двух концов он может изогнуться в форме полуволны. Схлопыванию струи в плоскую ленту способствует малое соотношение модулей Юнга сердечника  $E_c$  и оболочки  $E_s$ , а также малая толщина оболочки (быстрое испарение растворителя).

Прокомментируем особенности других полимеров, изображения которых приведены на рисунках 42 и 43, и их место в данной работе в целом. Среди пяти использованных полиэфиров, наиболее полно охарактеризованным является ПЛА, и этот полимер был выбран в качестве объекта исследования еще в двух частях данной работы (глава 4 и глава 5). Из ПЛА была получена серия образцов волокон с разными диаметрами (среднее $\pm$ SD от  $120\pm 40$  нм до  $1.60\pm 0.85$  мкм, рисунок 45). ПОБВ, сополимер двух полиэфиров, был использован в экспериментах по приготовлению смесевых мембран (глава 4). Мембраны из ПОБВ состояли из волокон с диаметром  $500\pm 90$  нм. ПКЛ отличается тем, что для него были использованы два метода получения субмикронных волокон. Выше упоминались крейзованные волокна (рисунок 39) с диаметром менее 25 нм, а с помощью электроформования были получены волокна с диаметром  $540\pm 180$  нм.

Оставшиеся два полиэфира, полидиоксанон и поли(пентадекалактон) (ПДО и ППДЛ, соответственно) можно назвать экзотическими, поскольку они используются гораздо реже, чем ПЛА, ПОБВ или ПКЛ. ПДО представляет собой гидрофильный полимер, в каждом звене которого присутствует как сложноэфирная, так и простая эфирная связь. В данной работе мембраны из ПДО состояли из волокон с диаметром  $460 \pm 260$  нм, их использовали в экспериментах с биосенсорами (глава 6). ППДЛ – это полимер, который по химической структуре, с одной стороны, похож на полиэтилен (в каждом мономерном звене присутствует четырнадцать групп  $\text{CH}_2$ ), а с другой является полиэфиром. Он отличается тем, что для получения бездефектных волокон ППДЛ использовали смесь ГФИП и хлороформа, причем содержание хлороформа составляло 30-40%. Чтобы приготовить прозрачный однородный раствор, его нагревали до  $40^\circ\text{C}$ , а затем остужали. Необходимость этих дополнительных шагов связана с тем, что ППДЛ не растворялся в чистом ГФИП, и при попытке изготовить электроформованную мембрану из мутной суспензии ППДЛ в ГФИП мы получали очень гетерогенные структуры с волокнами, лентами и крупными каплями сложной формы.

От полиэфиров перейдем к другим типам полимеров (рисунок 43). В работе были использованы два варианта нейлона, а именно, нейлон-6 и нейлон-11. Они оба хорошо

растворимы в ГФИП. В экспериментах по электроформованию из них были изготовлены мембраны со средними диаметрами волокон  $280 \pm 114$  нм и  $175 \pm 42$  нм. Мембраны из нейлона-6 были гидрофильны, легко впитывали воду и водные растворы, и их использовали в некоторых экспериментах по адсорбции крупных биомакромолекул (глава 6). Также использовали электроформованные мембраны из нитроцеллюлозы, т.к. она хорошо адсорбирует на себя белки и широко применяется в лабораторных анализах, например, в дот-блоттинге или вестерн-блоттинге. Электроформованные мембраны из нее были изготовлены из раствора НЦ в необычном растворителе – смеси ацетона и ДМФА (7:3 или 8:2 по объему). Именно такой растворитель обеспечивал оптимальный процесс электроспиннинга – при увеличении количества ацетона игла сравнительно быстро забивалась, а при увеличении количества ДМФА система переходила в режим электроспрея, т.е. вместо волокон формировались капли. При электроспиннинге НЦ использовали необычно высокое напряжение, 36-38 кВ вместо обычных 15-25 кВ.

Список исследованных полимеров завершают белки: фиброин, желатин и альбумин (БСА). Из них также были получены электроформованные волокна и нетканые мембраны. Фиброин и желатин использовали в экспериментах по корреляционной микроскопии (глава 3), а БСА и желатин были использованы в экспериментах по приготовлению полимер-белковых смесей (глава 4).

Если рассматривать электроформование в контексте разных способов получения субмикронных полимерных фибрилл, то этот метод представляется более гибким, чем другие. Он основан на том же фундаментальном принципе, что и крейзинг, а именно на способности полимеров к фибриллизации при растяжении. Он применим к широкому классу полимеров, включая природные гетерополимеры; позволяет получать как отдельные волокна на подложке, так и мембраны из них. Ниже будет показано, что он позволяет варьировать состав и пространственное расположение волокон: с его помощью могут быть изготовлены смесевые волокна и ориентированные волокна. В связи с этим именно метод электроформования занял центральное место в данной работе.

### **3. Корреляционная микроскопия и ее применение для исследования электроформованных мембран**

*Данная глава основана на материале статей [A17]-[A19]. Вклад автора состоял в разработке концепции эксперимента, проведении большинства измерений методом СЭМ, а также в анализе и обработке данных, включая разработку специализированных алгоритмов и программ.*

#### **3.1. Материалы и методы**

##### **3.1.1. Электроформование**

Объектами исследования были электроформованные мембраны и волокна на стекле, изготовленные из фиброина шелка или желатина. Их изготавливали из растворов в ГФИП, как описано выше в разделе 2.1.7, но с некоторыми особенностями. В растворы, предназначенные для электроспиннинга, вводили флуоресцентные метки. При проведении экспериментов с желатином, 10% используемого желатина составлял желатин, конъюгированный с FITC. При проведении экспериментов с фиброином шелка, в качестве флуоресцентной метки использовали TRITC или Hoeschst 34580. Для конъюгации фиброина с TRITC вначале изготавливали пористый матрикс, как описано в статье [222]. Его обрабатывали TRITC, чтобы краситель связался с фиброином шелка, а затем этот матрикс высушивали и перерастворяли в ГФИП для электроспиннинга. При использовании Hoeschst 34580 его добавляли непосредственно в раствор, предназначенный для электроспиннинга.

Чтобы приготовить отдельные электроформованные волокна на стекле, использовали следующую процедуру. Покровное стекло с диаметром 11 мм обрабатывали плазмой с помощью установки для плазменной очистки Zepto B (Diener electronic, Германия) в течение 10 минут при мощности 200 Вт и при давлении 600-800 мбар и покрывали тонким слоем металла (Au-Pd) с помощью установки Sputter Coater Q150T (Quorum Technologies, Великобритания). На нем делали метку: либо напыление процарапывали пластиковым наконечником дозатора, либо использовали лазерный гравёр Spirit GLS 100W. Подготовленную таким способом подложку располагали на металлическом коллекторе установки Nanofiber Electrospinning Unit, между напылением и коллектором обеспечивали электрический контакт и включали ускоряющее напряжение на очень короткое время,  $t \sim 1-10$  с. В результате на металлизированном стекле формировался тонкий слой волокон.

Чтобы приготовить мембраны для корреляционной микроскопии, их получали на пластиковой рамке, установленной между иглой шприца и проводящим коллектором.

Ее снимали, сушили под вакуумом для удаления остатков растворителя, а на ее поверхности делали метку с помощью лазерного гравера Spirit GLS 100W.

### **3.1.2. Измерения методом корреляционной микроскопии**

Измерения методом СЭМ проводили с помощью микроскопа Merlin (Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 1-5 кВ и электронном токе 50-70 пА; рабочее расстояние находилось в диапазоне 3.5-4.5 мм. Использовали детектор вторичных электронов Эверхарта-Торнли или внутрилинзовый детектор.

Измерения методом КЛСМ проводили с помощью микроскопа Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation, Япония). Съемку проводили через покровное стекло, расположенное поверх волокон. Использовали объектив Apo TIRF Plan Fluor 63×/1.49 или CFI Plan Apo VC 20×/0.75. Для возбуждения флуоресценции использовали лазеры с длиной волны 408 нм для Hoechst 34580, 488 нм для FITC или 532 нм для TRITC.

Последовательность применения методов СЭМ и КЛСМ зависела от конкретного эксперимента и описана ниже.

### **3.2. Принцип корреляционной микроскопии**

Наиболее удобным методом визуализации электроформованных волокон является СЭМ. Действительно, этот метод обеспечивает пространственное разрешение на уровне ~10 нм, что отлично подходит для измерения диаметров волокон и описания особенностей их структуры (например, лент или волокон с пористой поверхностью), и при этом метод СЭМ сравнительно быстрый и не очень требователен к подготовке образца. В результате он стал практически негласным стандартом. Однако в некоторых случаях получаемых им данных оказывается недостаточно, либо его использование затруднено. Например, с его помощью практически невозможно оценить внутреннюю структуру мембраны, т.е. описать расположение волокон в ее объеме. Хотя методом СЭМ можно построить распределение поверхностных пор по размерам, это распределение будет существенно зависеть от выбранного порога (значения, которое отделяет волокна от фона при обработке изображений), а объемная пористость практически недоступна для измерений. Кроме того, в ряде биологических экспериментов необходимо визуализировать клетки, находящиеся на поверхности электроформованной мембраны, и при подготовке таких образцов для исследования методом СЭМ может возникнуть большое количество артефактов. Эти проблемы могут быть решены, если использовать метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). Его используют для электроформованных мембран сравнительно

редко, т.к. диаметры волокон могут быть меньше предела разрешения, тем не менее, во многих случаях он оказывается очень полезен для исследования структуры как самих электроформованных мембран, так и тканеинженерных конструкций на их основе.

В данной работе электроформованные волокна и мембраны были исследованы методом корреляционной микроскопии. Смысл этого подхода состоит в том, чтобы получить изображения одного и того же участка поверхности образца двумя аналитическими методами последовательно. Такая организация эксперимента подразумевает, что мы можем найти области интереса на макроскопическом образце после его перемещения между двумя микроскопами. Эти метки наносили на образцы методом лазерной гравировки. Образцы представляли собой либо отдельные волокна на металлизированном стекле (Рисунок 46 А), либо электроформованные мембраны с толщиной более 50 мкм (Рисунок 46 Б). В обоих случаях положение исследуемых областей выбирали не случайно, а вблизи макроскопической метки, которую можно было обнаружить обоими используемыми методами. Если образец представлял собой волокна на металлизированном стекле, то метку наносили на слой металла, а если образец представлял собой мембрану, то метку наносили непосредственно на нее.

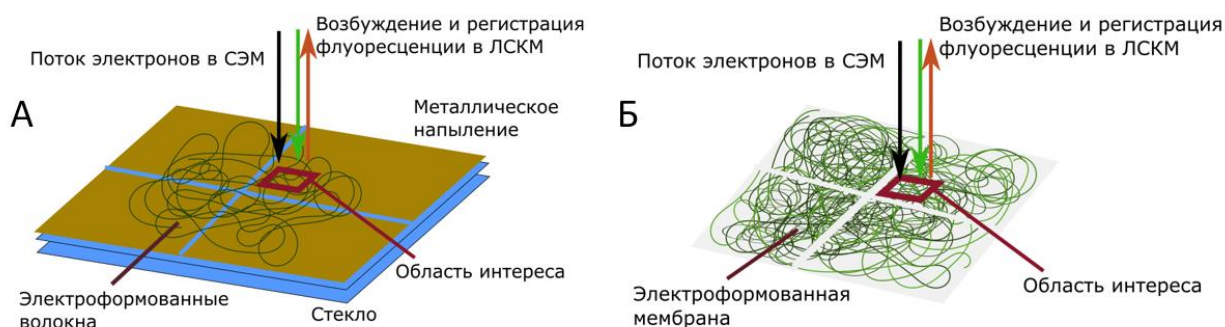


Рисунок 46 – Принципиальная схема эксперимента по корреляционной микроскопии. Образец представляет собой отдельные волокна на металлизированном стекле (А) или свободную мембрану (Б). Метка в обоих случаях показана двумя скрещенными линиями. При измерениях методом КЛСМ образец можно накрыть сверху покровным стеклом, оно не показано на схеме.

Последовательность использования методов можно изменять: либо использовать сначала КЛСМ, затем СЭМ, либо наоборот, сначала СЭМ, затем КЛСМ. Каждый из этих двух вариантов обладает своими особенностями. Если метод КЛСМ используется первым, то после завершения оптических измерений можно покрыть образец металлом, не опасаясь того, что металлическое покрытие затруднит возбуждение и регистрацию флуоресценции. Металлическое покрытие в общем случае упрощает измерения методом СЭМ. Если же метод СЭМ используется первым, то измерения необходимо проводить

без металлического напыления (выше было показано, что на современном микроскопе это возможно), но перед оптическими измерениями образец можно заключить в заливочную среду. Этот шаг улучшает разрешение КЛСМ, и при работе с тонкими волокнами радикально улучшает изображения.

Для проведения измерений методом КЛСМ в волокнах должна быть флуоресцентная метка. Нами были использованы три разные метки, флуоресценция которых лежит в разных частях спектра: красно-оранжевый TRITC ( $\lambda_{exc} \sim 540\text{--}550$  нм,  $\lambda_{em} \sim 565\text{--}580$  нм), зеленый FITC ( $\lambda_{exc} \sim 490\text{--}495$  нм,  $\lambda_{em} \sim 515\text{--}520$  нм) и Hoechst 34580 ( $\lambda_{exc} \sim 350\text{--}360$  нм,  $\lambda_{em} \sim 460\text{--}470$  нм). Эти три красителя были введены разными способами: FITC ковалентно конъюгирован с белком (рисунок 47), TRITC неспецифически нанесен на пористый матрикс из белка (рисунок 48), а Hoechst добавлен в раствор в свободном виде (рисунок 49), а не в конъюгированном. Каждый из этих трех красителей позволил получить пары изображений одного и того же участка поверхности (способ введения красителя в волокна не принципиален). С некоторых изображений, которые приводятся на рисунках 47-49, были убраны масштабные метки; в данном случае принципиален не размер исследуемых объектов (большинство волокон являются субмикронными или имеют размер порядка  $\sim 1$  мкм), а принципиальная возможность их визуализации двумя методами микроскопии последовательно. Для удобства сопоставления изображения модифицировали: поворачивали, отражали, а на изображениях, полученных методом КЛСМ, оптимизировали яркость или контраст. Эти процедуры не изменяют попарных расстояний между точками изображения, поэтому морфология объектов при этих модификациях сохранялась.

Можно использовать методы в разном порядке: сначала СЭМ, затем КЛСМ (рисунок 47) или сначала КЛСМ, затем СЭМ (рисунок 48). В обоих случаях мы можем получить пару изображений выбранного участка поверхности, но на практике оказалось, что последовательность «сначала СЭМ, затем КЛСМ» предпочтительна, т.к. позволяет заключить образец в заливочную среду и тем самым улучшить разрешение.

При исследовании образца методом СЭМ использовали либо детектор Эверхарта-Торнли, либо внутрилинзовый детектор (рисунок 47 А и Б соответственно). Оба они обеспечивали достаточную чувствительность, чтобы можно было получить изображение без напыления металла (в данном случае съемка проводилась при ускоряющем напряжении 1 кВ и токе электронного пучка 70 пА).

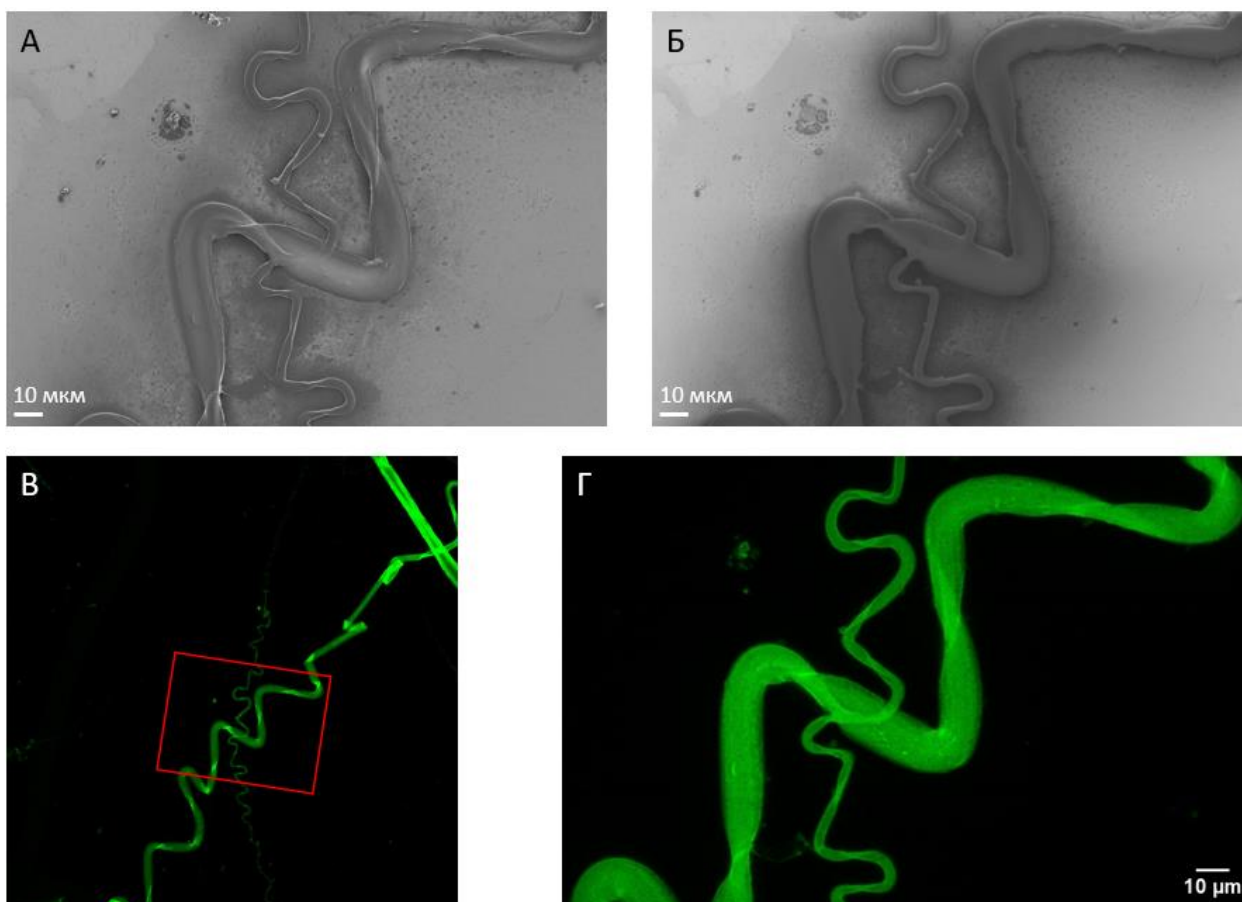


Рисунок 47 – Пара изображений электроформованных волокон желатина, полученных с помощью корреляционной микроскопии, краситель FITC. А, Б – СЭМ-изображения, полученные с использованием детектора Эверхарта-Торнли и внутрилинзового детектора, соответственно, съемка без напыления металла. В, Г – изображения, полученные методом КЛСМ, проекции максимальной интенсивности. Сначала были получены изображения А и Б, затем образец перенесли к КЛСМ, и получили изображения В, Г.

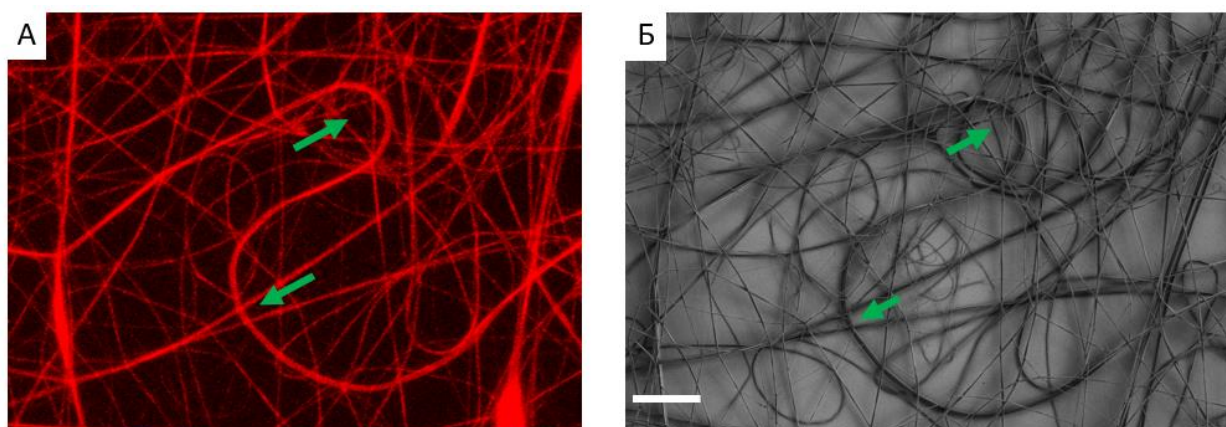


Рисунок 48 – Пара изображений электроформованных волокон фиброина, полученных с помощью корреляционной микроскопии, краситель TRITC. А – изображение, полученное методом КЛСМ, проекция максимальной интенсивности. Б – изображение, полученное методом СЭМ, длина масштабной метки 20 мкм. Сначала было получено изображение А, затем образец перенесли к СЭМ и получили изображение Б.

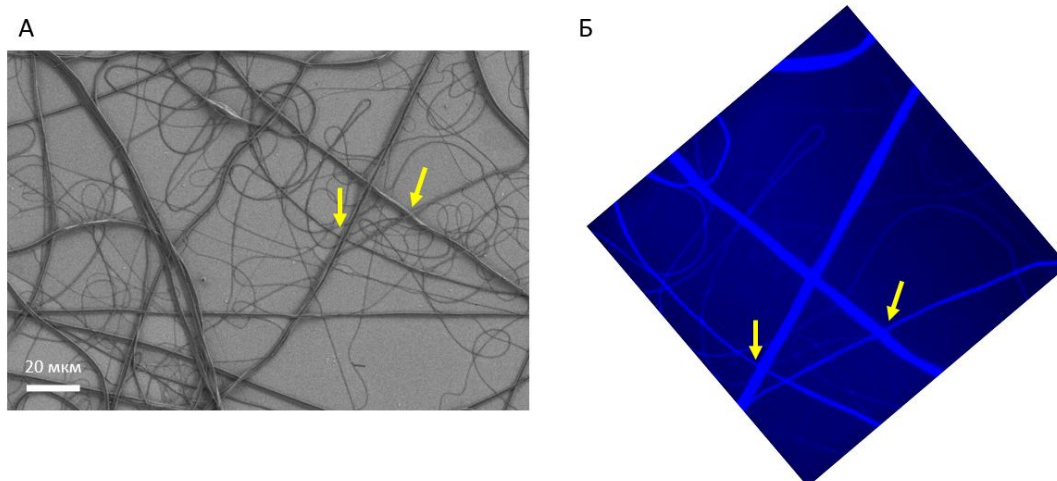


Рисунок 49 – Пара изображений электроформованных волокон фиброина, полученных с помощью корреляционной микроскопии, краситель Hoechst 34580. А – изображение, полученное методом СЭМ. Б – изображение, полученное методом КЛСМ, проекция максимальной интенсивности. Сначала было получено изображение А, затем образец перенесли к КЛСМ и получили изображение Б.

Изображения, полученные методом КЛСМ, обычно показывают с использованием палитры цветов, которая соответствует цвету флуоресцентного красителя, как сделано на рисунках 47-49. Тем не менее, в дальнейшем эти изображения будут приведены в оттенках серого, чтобы лучше соответствовать СЭМ-изображениям (рисунок 50).

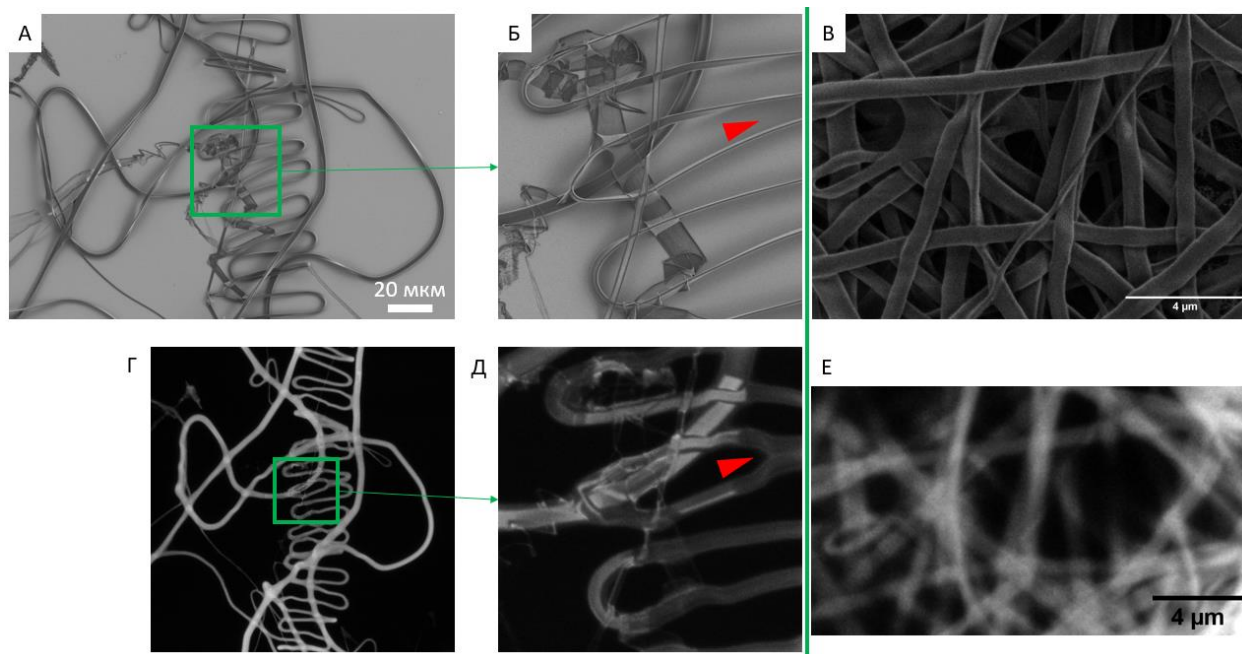


Рисунок 50 – Пары изображений, полученных с помощью корреляционной микроскопии. Верхний ряд – СЭМ-изображения, нижний ряд - проекции максимальной интенсивности по конфокальным z-стекам. (А, Б, Г, Д) – волокна желатина на металлической подложке, краситель FITC, (В, Е) – волокна фиброина шелка, краситель Hoechst 34580.

На качественном уровне видно, что изображения, полученные методами СЭМ и КЛСМ, соответствуют одному и тому же участку поверхности. Однако эти изображения не должны быть полностью одинаковыми. Действительно, изображение, полученное методом КЛСМ, показывает расположение флуоресцентного красителя в исследуемой области, причем обычно мы работаем с проекцией максимальной интенсивности, а значит, искусственно собираем в одном кадре волокна, которые лежат в разных плоскостях. Изображение, полученное методом СЭМ, сформированное в основном с помощью вторичных электронов, содержит резкие изменения яркости на краях волокон. Контраст на этом изображении зависит от рельефа поверхности (эмиссия вторичных электронов зависит от угла наклона поверхности), а также от материала образца. Сложно ожидать полного соответствия в каждом пикселе двух изображений, полученных этими способами.

Расположение некоторых волокон было разным на изображениях, полученных методами КЛСМ и СЭМ. Например, на рисунке 50 Б, Д красным треугольником в правой части кадра показана пара волокон, которые по данным СЭМ расположены на расстоянии 2.9 мкм, а по данным КЛСМ непосредственно касаются друг друга. Такие ситуации несколько раз встречались на изображениях и, скорее всего, отражают подвижность волокон. Она приводила к тому, что при переносе образца между микроскопами и заключении образца в заливочную среду их расположение изменилось.

Пары изображений, полученные в экспериментах по корреляционной микроскопии, поднимают вопрос о том, как соотносятся размеры волокон, измеряемые разными методами. Чтобы ответить на него, сравним диаметры индивидуальных волокон, измеренные двумя методами, для образцов электроформованных волокон – фиброина, содержащего краситель Hoechst 34580 и желатина, содержащего FITC (рисунок 51). Для фиброина наблюдалось отличное соответствие между диаметрами, измеренными СЭМ и КЛСМ (коэффициент корреляции  $r=0.94$ ). Для волокон малого диаметра ( $d_{\text{СЭМ}} < 200$  нм) наблюдалось расхождение – самые тонкие волокна не были видны методом КЛСМ. Теоретический предел разрешения КЛСМ можно оценить по формуле

$$\Delta = f(D) \frac{\lambda}{NA}$$

где  $\lambda$  – длина волны возбуждения, NA – числовая апертура, а  $f(D)$  – функция от диаметра диафрагмы, значение которой обычно близко к 0.51 [223]. В описываемых экспериментах предел разрешения, вычисленный по этой формуле, составлял  $\Delta=150$  нм.

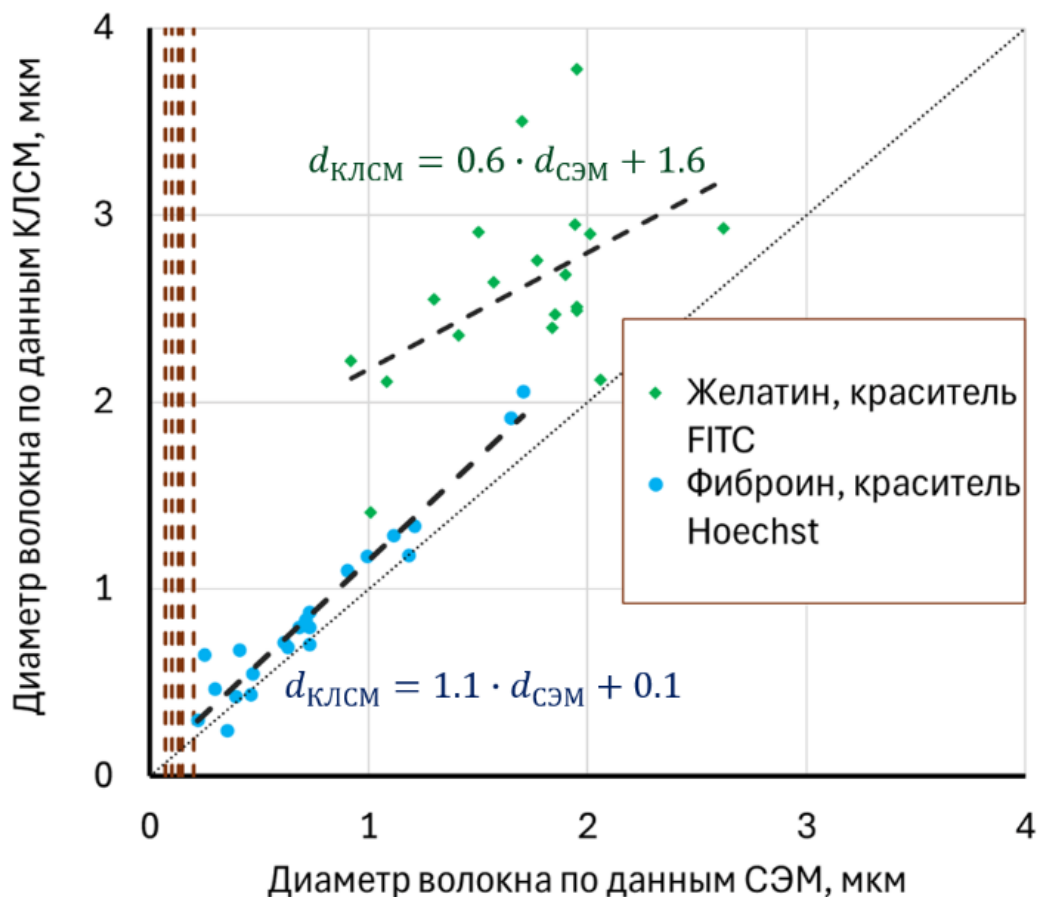


Рисунок 51 – Сравнение данных о диаметрах электроформованных волокон фиброина шелка и желатина, полученных методами СЭМ и КЛСМ. Вертикальные пунктирные линии соответствуют волокнам, которые не были видны методом КЛСМ.

Для желатина диаметры большинства волокон, измеряемые методом КЛСМ, оказывались больше, чем по данным СЭМ (коэффициент корреляции составил  $r=0.36$ ). Видно также, что большинство точек лежат выше линии  $Y=X$ , т.е. КЛСМ дает завышенные данные о размерах волокон. Вероятная причина этого состоит в том, что волокна желатина набухали при заключении в заливочную среду (коэффициент набухания в воде более 900% [224]); для фиброина коэффициент набухания в воде меньше (90-100% [225], [226]), и этот эффект менее важен.

Корреляционная микроскопия, объединяющая СЭМ и КЛСМ, ранее использовалась для различных образцов, включая клетки на подложке [227], [228], срезы биологических тканей [229], [230] и внеклеточные везикулы [231] (в указанной работе

использована не обычная КЛСМ, подразумевающая внесение флуоресцентных меток в образец, а конфокальная КР-микроскопия). Корреляционную микроскопию СЭМ-КЛСМ применяют, прежде всего, для биологических образцов, т.к. метод КЛСМ популярен именно в биологии. На этом фоне описанные в данной работе эксперименты по использованию корреляционной микроскопии для полимерных волокон и мембран представляется новым направлением.

### **3.3. Особенности анализа данных в корреляционной микроскопии**

Наиболее полную информацию о структуре образца можно получить, если не сжимать z-стек до проекции максимальной интенсивности, как на приведенных выше рисунках 47-50, а анализировать его непосредственно, как трехмерный массив данных. При этом возникает вопрос о том, как сопоставлять данные, полученные методами КЛСМ и СЭМ – необходимо сопоставить объемные данные (трехмерный массив точек) с поверхностными (двумерный массив точек). Это сопоставление тесно связано с вопросом о том, насколько глубоко расположены те волокна, которые доступны для исследования методом СЭМ. Эксперименты по корреляционной микроскопии, выполненные в данной работе, позволили ответить на этот вопрос.

Целесообразно выделить на z-стеке те точки, которые соответствуют верхним (расположенным наиболее высоко) точкам волокон. Эта задача является частью более общей задачи сегментации – отделения волокон от фона. Ее решение осложняется тремя обстоятельствами.

1. z-стеки, как и другие изображения, полученные методами флуоресцентной микроскопии, всегда зашумлены, и шум мешает отделить объекты от фона. Различные варианты снижения уровня шума (прежде всего, размытие и медианная фильтрация) снижают остроту этой проблемы, но одновременно размывают границы волокон.

2. По мере того, как рассматриваемая область (срез) уходит вглубь образца, возбуждать и собирать оптический сигнал становится все сложнее из-за поглощения и рассеяния света, и интенсивность сигнала снижается. Для компенсации снижения интенсивности используют разные виды коррекции, которая может выполняться либо непосредственно в процессе съемки, либо после нее [232].

3. Поверхность образца может быть не плоской, а изогнутой, и переход от пустого объема к волокнам будет происходить на разной глубине не только из-за разной глубины залегания волокон, но и из-за макроскопических особенностей формы образца. Вместе с пунктом 2, этот пункт создает вариации интенсивности сигнала по глубине.

Некоторые авторы непосредственно подчеркивают алгоритмическую сложность обсуждаемой задачи [233]. Применяя алгоритмы сегментации (отделения сигнала от фона) к z-стеку  $I(x, y, z)$ , можно получить бинарную маску  $B(x, y, z) = \{0; 1\}$ , т.е. набор точек в трехмерном пространстве, который показывает, какие точки исследованного объема принадлежат волокнам ( $B=1$ ), а какие – порам ( $B=0$ ). Далее, из каждого столбца можно выбрать верхний пиксель волокна и получить изображение поверхности мембраны по данным КЛСМ (рисунок 52 А). Оттенок каждой точки на этом изображении показывает ее z-координату в наборе  $B(x, y, z)$  и не отражает интенсивности флуоресценции, которая была зарегистрирована КЛСМ.

Изображение, получаемое при такой процедуре, зависит от способа построения маски  $B(x, y, z)$  и в общем случае оно может оказаться не совсем корректным – из-за шумов и неоднозначности выбора порога. Однако его сопоставление с соответствующим СЭМ-изображением позволяет проверить, что маска была построена корректно (Рисунок 52 Б).

Далее можно оценить глубину расположения точек поверхности. Это будет косвенной оценкой того, насколько глубоко в образец может заглянуть СЭМ. Построим гистограмму z-координат точек, расположенных на поверхности волокон (одна из гистограмм, полученных для фиброина шелка, показана на рисунке 52 В). Оказалось, что не менее 90% точек такой гистограммы соответствуют диапазону глубины 1.5-2 мкм, т.е. при характерном диаметре волокна  $d \sim 500$  нм это соответствует 3-4 слоям волокон. Эта величина является оценкой глубины, доступной СЭМ, при исследовании электроформованных мембран. Эта глубина определяется, прежде всего, структурой мембраны, а не глубиной проникновения электронного пучка в полимер. Для сравнения, если говорить о глубине проникновения электронов, то ее можно оценить, используя формулу Канайя-Окаяма [234]:

$$R_{K-O} = 0.0276 \cdot E^{1.67} \left( \frac{A}{Z^{0.889} \rho} \right)$$

При минимальном ускоряющем напряжении  $E=1$  кВ в предположении образца, состоящего полностью из углерода ( $A=12$  г/моль,  $Z=6$ ), при  $\rho=1.2$  г/см<sup>3</sup>, получаем значение  $R_{K-O} \sim 56$  нм, что заметно меньше диаметра волокна.

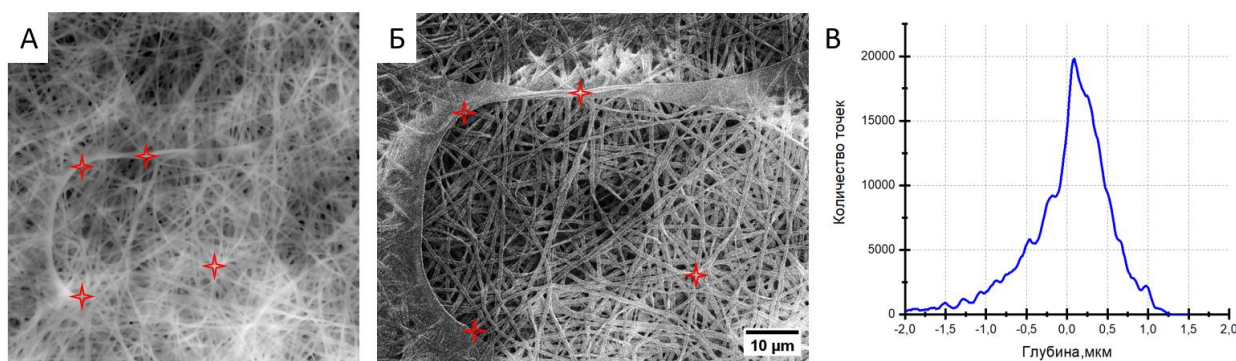


Рисунок 52 – Образец фиброина шелка. А – изображение поверхности по данным КЛСМ. Б – СЭМ-изображение. В – гистограмма распределения точек по глубине. Красные звездочки на А и Б показывают характерные структурные элементы.

Итак, при обработке z-стеков, полученных методом КЛСМ, можно выделить верхние светящиеся точки (с учетом шумов, наклона образца и неоднородности засветки по глубине образца). В результате формируется изображение поверхности, схожее с изображением, полученным методом СЭМ. При анализе изображений электроформованных мембран из фиброина шелка было установлено, что при съемке методом СЭМ мы видим в основном 3-4 верхних слоя волокон.

### 3.4. Разработка структурной модели электроформованной мембраны

Эксперименты по корреляционной микроскопии показывают, что для описания электроформованных мембран может быть полезна структурная модель, которая позволит проследить взаимосвязи между различными характеристиками волокон: их диаметрами, плотностью укладки, гибкостью и т.п. Такая модель была построена: она представляет собой набор скриптов на языке Python, которые моделируют расположение волокон в определенном объеме виртуального пространства. Результат моделирования – это модель мембраны, которая может быть представлена в двух взаимосвязанных вариантах: «кратком» и «детальном». В «кратком» варианте модель представляет собой набор из  $N$  волокон, расположенных в виртуальном параллелепипеде известного размера  $LX \times LY \times LZ$ , причем про каждое волокно известен ход его оси и диаметр. В «детальном» варианте этот же набор волокон описывается как множество точек на квадратной сетке, заполняющих объем  $LX \times LY \times LZ$ , каждая из которых хранит либо номер волокна, которому она принадлежит, либо ноль, если эта точка относится к порам. Переход от «краткого» представления к «детальному» состоит в том, чтобы просмотреть точки сетки и, если расстояние от определенной точки до оси  $i$ -го волокна меньше его диаметра  $D_i/2$ , то присвоить точке номер волокна  $i$  вместо нуля. Переход от «детального» представления к «краткому» более сложен (необходима

векторизация растрового массива данных) и менее востребован, и поэтому он не был реализован.

Модель мембраны строится путем последовательного заполнения исследуемого объема волокнами, причем они добавляются к модели последовательно, как это происходит в экспериментах по электроформованию. Формально каждое волокно добавляется к модели в два этапа. На первом этапе мы создаем траекторию оси волокна. Это кривая, расположенная в плоскости  $Z=LZ$ , которая может представлять собой отрезок, дугу окружности (центр окружности расположен за пределами прямоугольника  $LX \times LY$ ) или описываться персистентной моделью. В последнем случае при смещении вдоль кривой на расстояние  $l$  вероятность изменить направление на угол  $\Delta\vartheta$  составляет

$$P(\Delta\vartheta) = \frac{1}{\sqrt{2\pi l/l_p}} e^{-\frac{(\Delta\vartheta)^2}{2(l/l_p)}}$$

Применимость этой модели для описания электроформованных волокон была показана в работах [235], [236], а также в некоторых наших экспериментах с ПЛА.

На ось волокна, созданную в плоскости  $Z=LZ$ , накладываются фактически три ограничения. Во-первых, это соответствие выбранной геометрической модели (отрезок, дуга окружности или персистентная модель). Во-вторых, существует ограничение на количество точек, оно состоит в следующем. В плоскости  $Z=LZ$  мы рассматриваем прямоугольник с размером  $LX \times LY$  – начальная и конечная точка кривой (оси волокна) лежат на его сторонах. Если количество точек кривой меньше определенного порога, то такая кривая не используется. Это условие необходимо, т.к. иначе в результате случайного выбора осью волокна может стать очень маленький фрагмент, расположенный вблизи краев прямоугольника  $LX \times LY$ , не представляющий интереса из-за малой длины. Третье ограничение – это отсутствие самопересечений. Это ограничение облегчает вычисления, связанные с построением модели, но исключает из рассмотрения те мембраны, при формировании которых формировались явные петли из волокон (пример петли есть на рисунке 49).

Когда сформирована ось волокна, и для него выбран диаметр  $D_i$ , волокно начинает «падать» к коллектору – координаты точек его оси последовательно уменьшаются от начального  $Z=LZ$  до конечного  $Z=D_i/2$  или до выполнения условия остановки, которое будет прокомментировано ниже. При этом они все время находятся внутри криволинейной поверхности  $\Sigma$ , параллельной оси  $Z$  (рисунок 53). Такое перемещение оси волокна соответствует заключительной части формирования волокна в

эксперименте. Если волокно расположено вблизи коллектора, то для любого его сегмента его взаимодействие с коллектором значительно выше, чем с другими сегментами этого же волокна.

Чтобы определить условие остановки, необходимо рассматривать другие волокна, которые проходят через поверхность  $\Sigma$ , причем уже в «детальном» представлении, в котором учтены все точки волокна, а не только его ось. Каждая из  $N_p$  точек оси рассматриваемого нового волокна характеризуется безразмерным параметром остановки  $S_i$ , где  $i=1..N_p$ . Параметр  $S_i$  принимает значения от нуля (в начале рассмотрения, когда волокно находится в плоскости  $Z=LZ$ ) до максимального  $S_{max}$ , и эти значения обновляются на каждом шаге движения волокна в сторону коллектора. Если для какой-то точки волокна параметр  $S_i$  принимает значение, превосходящее или равное  $S_{max}$ , то эта точка больше не смещается. Если непосредственно под определенной точкой находится другое волокно или коллектор (на расстоянии радиуса волокна  $D_i/2$ ), то она немедленно получает  $S_i = S_{max}$ . Для всех остальных точек на каждом шаге  $t+1$  значения  $S_i \leq S_{max}$  обновляются следующим образом. Точки, для которых значение параметра остановки равно  $S_{max}$ , вносят вклад в параметр остановки соседних точек, описываемый распределением Гаусса  $H \cdot N(i - j, \sigma^2)$ . В этой формуле  $H$  и  $\sigma$  – безразмерные параметры, которые характеризуют интенсивность механического взаимодействия между точками волокна,  $N(...)$  обозначает распределение Гаусса, а  $i-j$  – расстояние между точками (той, которая уже остановилась, и той, которая набирает параметр остановки). Рост значений  $S_i$  можно выразить по формуле

$$S_i(t+1) = \min (S_i(t) + \sum_{j: S_j(t)=S_{max}} H \cdot N(i - j, \sigma^2), S_{max})$$

Если параметры  $H$  и  $\sigma$  велики (строго говоря, важно не  $H$  само по себе, а соотношение  $H/S_{max}$ ), то точки будут останавливаться за меньшее количество шагов – за счет того, что первая же остановившаяся точка будет «распространять» вокруг себя большое значение параметра  $S$ . В этом случае волокна будут практически горизонтальными – они не проваливаются по направлению к коллектору. Если же соотношение  $H/S_{max}$  мало, то волокна будут мягкими в том смысле, что каждое волокно будет проваливаться в поры между другими волокнами. Значение  $S_i(t+1)$  вычисляется как минимум из величины  $S_{max}$  и указанной суммы, чтобы рост  $S$  не был бесконечным.

Такой подход к расчету критерия остановки проще и быстрее, чем непосредственное решение уравнений движения заряженных волокон в электрическом поле [235-237]. В то же время, такой подход имеет ряд очевидных ограничений. Он не

учитывает механических характеристик волокон, кроме того, волокно останавливается только в том случае, если его ось встретит препятствие, а если препятствие встретят точки волокна, не принадлежащие поверхности  $\Sigma$ , то такое препятствие будет проигнорировано. Это означает, что зацепление края волокна А за другое, уже лежащее на подложке волокно Б, не приведет к остановке волокна А. Несмотря на эти ограничения, обсуждаемая модель позволяет получать нетривиальные трехмерные модели, как будет проиллюстрировано ниже.

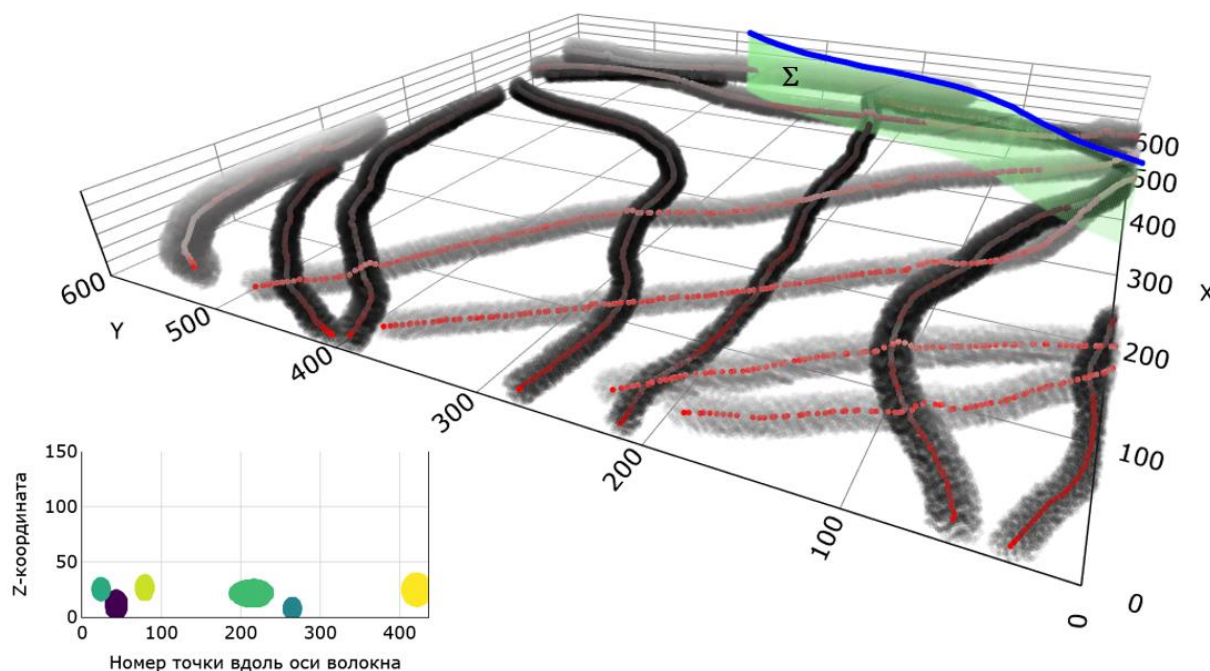


Рисунок 53 – Криволинейное сечение объема поверхностью  $\Sigma$ , в котором происходит «падение» волокна на коллектор.

Когда ось волокна остановлена, происходит переход от «краткого» представления к «детальному». Программа просматривает точки объема  $V'$ , расположенного вблизи остановившейся оси волокна, и сравнивает расстояние от них до точек оси волокна с радиусом  $D_i/2$ . Чтобы не перебирать все точки объема  $V$  (это затратно по вычислительным ресурсам и долго), целесообразно сократить объем до  $V' \subset V$ : границы объема  $V'$  вдоль каждой из осей выбираются как минимальные и максимальные значения, которые могут принимать точки волокна. Например, если точки оси волокна имеют  $x$ -координаты  $X_i$ , то объем  $V'$  вдоль оси  $X$  ограничен диапазоном от  $\min(X_i - D_i/2)$  по всем  $X_i \geq D_i/2$  и  $\max(X_i + D_i/2)$  по всем  $X_i \leq LX - D_i/2$ . Обычно получалось, что объем  $V'$  составлял порядка  $\sim 1\%$  от объема  $V$ . Кроме того, для ускорения расчетов используется не прямой перебор всех точек, а алгоритм поиска ближайших точек в метрическом

пространстве с помощью kd-деревьев, описанный в статье [238] – он реализован в Python в виде функции `cKDTree` библиотеки `scipy`. Если точка пространства принадлежит волокну (расстояние от нее до оси волокна не превосходит  $D_i/2$ ), то в нее записывается номер этого волокна. После этого волокно считается созданным, и программа переходит к созданию следующего волокна.

Плотность расположения волокон можно регулировать еще одним нетривиальным параметром: средним количеством волокон в слое  $N_{\text{allowed}}$ . Если случайно созданные оси волокон будут проходить вблизи одной и той же точки в плоскости  $Z=LZ$ , то толщина виртуальной мембраны  $h$ , измеряемая от плоскости коллектора до верхней точки верхнего волокна, будет увеличиваться с каждым добавленным волокном. При этом будет наблюдаться закономерность  $h \sim \frac{D_{\min}+D_{\max}}{2} \cdot N_x$ , где  $D_{\min}$  и  $D_{\max}$  – это границы диапазона, в котором лежат диаметры волокон, а  $N_x$  – количество волокон, которые накладываются друг на друга вблизи одной точки. Хотя вероятность прохождения множества волокон вблизи одной и той же точки мала, можно дополнительно ограничить скорость роста толщины следующим образом. Допустим, для волокна с номером  $N$  создана ось, выбран его диаметр, и выбрана поверхность  $\Sigma$ , в которой ось волокна будет двигаться к коллектору. Программа вычисляет координату верхней точки остановившегося волокна и, если она выше, чем  $\frac{D_{\min}+D_{\max}}{2} \cdot \frac{N}{N_{\text{allowed}}}$ , отбрасывает такое волокно и генерирует новое.

Результатом работы программы является модель мембраны, причем ее «детальное» представление можно сохранить в виде многостраничного tiff-файла, как это часто делают по результатам измерений методом КЛСМ. Его можно просматривать в виде трехмерной структуры, и это получается очень информативно, т.к. в этой модельной структуре нет шума (рисунок 54).

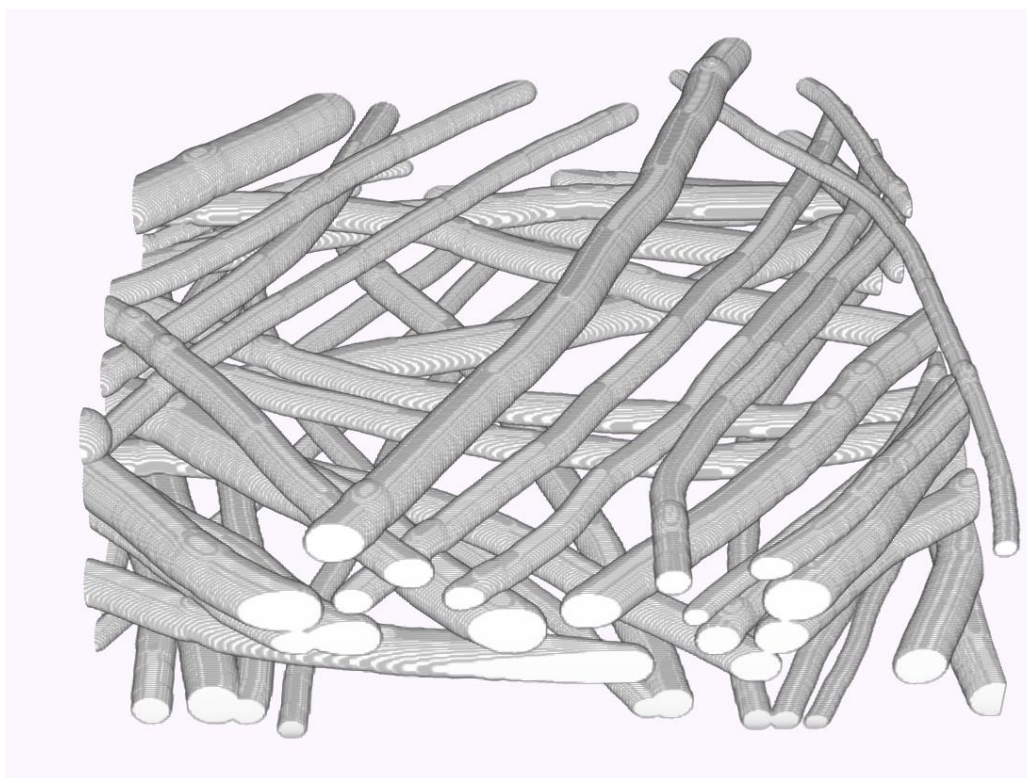


Рисунок 54 – Модель электроформованной мембраны из 50 волокон.

Кроме того, структуры можно отображать в виде проекций или набора верхних точек z-стека, как это было сделано выше в предыдущем разделе. При выделении верхних точек волокон удобно выбирать оттенок пикселя пропорциональным номеру волокна или z-координате соответствующей точки (рисунок 55 А и Б соответственно). Первое из этих двух представлений напрямую соответствует способу создания модели, а второе – более наглядное и реалистичное (точки, расположенные выше, выглядят более яркими, чем точки, расположенные в глубине мембраны). Разница между этими двумя представлениями становится ясной при анализе графиков сечений (рисунок 55 В). Если цвет точки соответствует номеру волокна, то на графике сечения каждому волокну соответствует строго горизонтальный участок – это показано фиолетовой линией. Если же при построении «детальной» модели мы сохранили в каждой точке волокна ее z-координату, то мы получаем более реалистичное изображение, и на графике сечения верхняя часть каждого волокна выглядит скругленной (темно-оранжевая кривая).

Кроме того, по этим данным можно создать синтетическое СЭМ-изображение. Расчет СЭМ-изображения по известной структуре образца является нетривиальной задачей, требующей анализа взаимодействия между электронным пучком и образцом [239-241]. Однако в данном случае можно использовать более простой подход,

основанный на приемах обработки изображений оконными фильтрами. Действительно, принципиальное отличие изображения на рисунке 55 Б от типичных СЭМ-изображений электроформованных мембран состоит в том, что при съемке методом СЭМ края волокон обычно получаются яркими. Это особенно хорошо заметно при использовании внутрилинзового детектора. Чтобы создать такой эффект на синтетическом изображении, можно использовать следующий подход. В каждой точке найдем направление локального градиента  $lx(x,y)$  и  $ly(x,y)$ , используя операторы Превитта:

$$Kx = \frac{1}{6} \begin{pmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & -1 \end{pmatrix}, \quad Ky = \frac{1}{6} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 \end{pmatrix}$$

Зная их, в каждой точке вычислим функцию  $kz=(1 + lx^2 + ly^2)^{-0.5}$ . Эта функция принимает значения из полуинтервала (0; 1]: она мала в тех точках, вблизи которых интенсивность изображения резко изменяется, и равна единице в тех точках, вблизи которых оттенок постоянный ( $lx=ly=0$ ). Значения функции  $kz$  формировали матрицу, которую подвергали размытию, и на ее основе формировали матрицу поправок – она позволяла сделать края волокон на изображении более яркими. Результат поэлементного умножения исходного изображения (рисунок 55 Б) на матрицу поправок представлен на рисунке 55 Г. Если дополнительно добавить к нему гауссовский шум, то результат будет трудно отличим от СЭМ-изображения (рисунок 55 Д).

Примеры синтетических СЭМ-изображений, построенных для волокон разных форм, представлены на рисунке 56. Они были получены по результатам создания моделей, содержащих по 60 волокон с диаметрами, равномерно распределенными в диапазоне от 10 до 40 пикселей, вписанными в объем 600х600х400 точек. Таким образом, созданная в данной работе программа позволяет генерировать синтетические СЭМ-изображения электроформованных мембран. Они могут быть использованы для отработки алгоритмов анализа геометрических характеристик мембран по их изображениям, для сравнения объемных и поверхностных свойств мембран, а также для обучения нейросетей, предназначенных для анализа изображений волокнистых материалов.

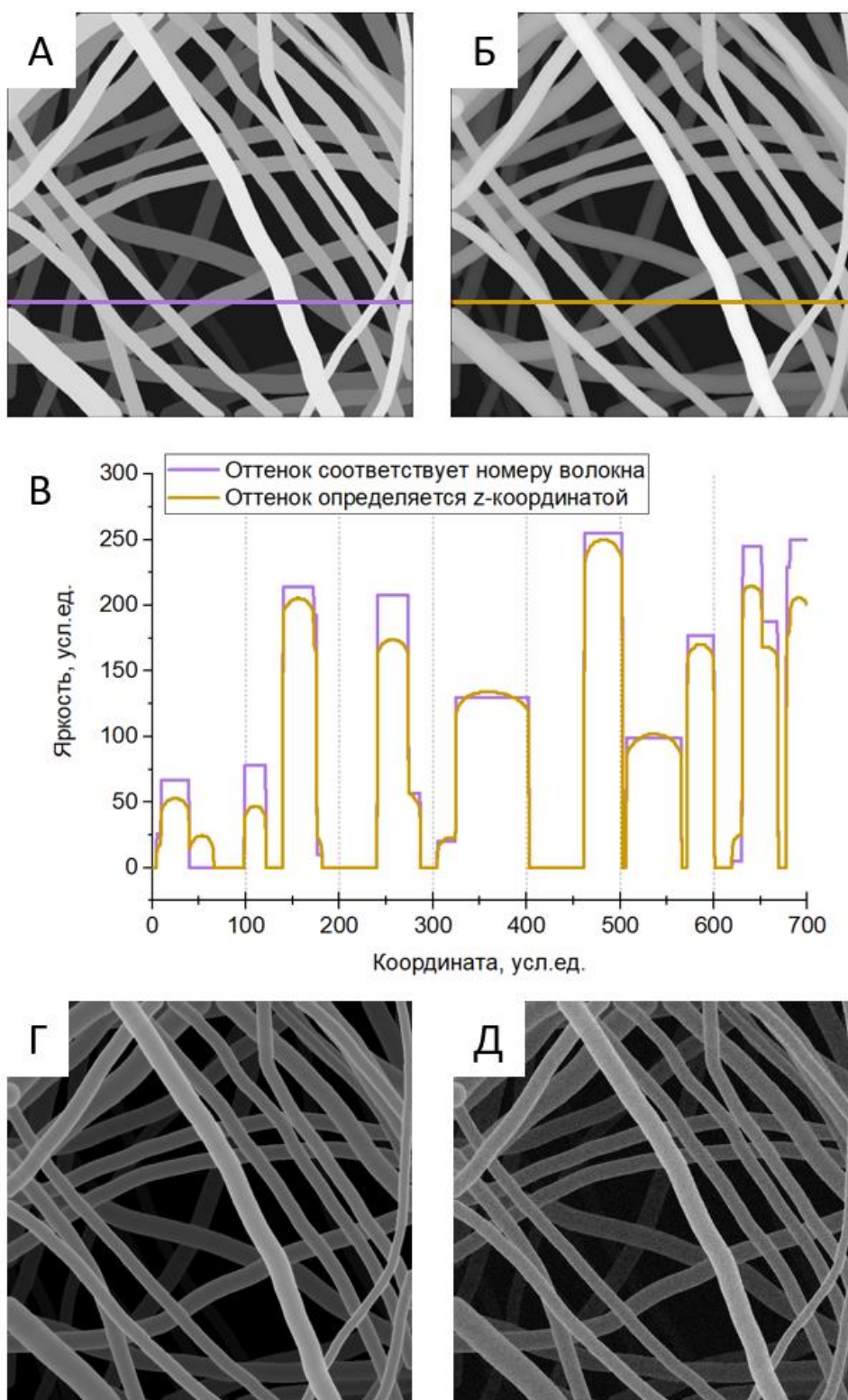


Рисунок 55 – Синтетические изображения структуры мембран. А – изображение поверхности, цвет точки соответствует номеру волокна. Б – изображение поверхности, на котором цвет точки соответствует ее z-координате в структуре, В – графики сечений вдоль горизонтальных линий на А и Б, Г – синтетическое СЭМ-изображение без шума, Д – синтетическое СЭМ-изображение с добавленным шумом.

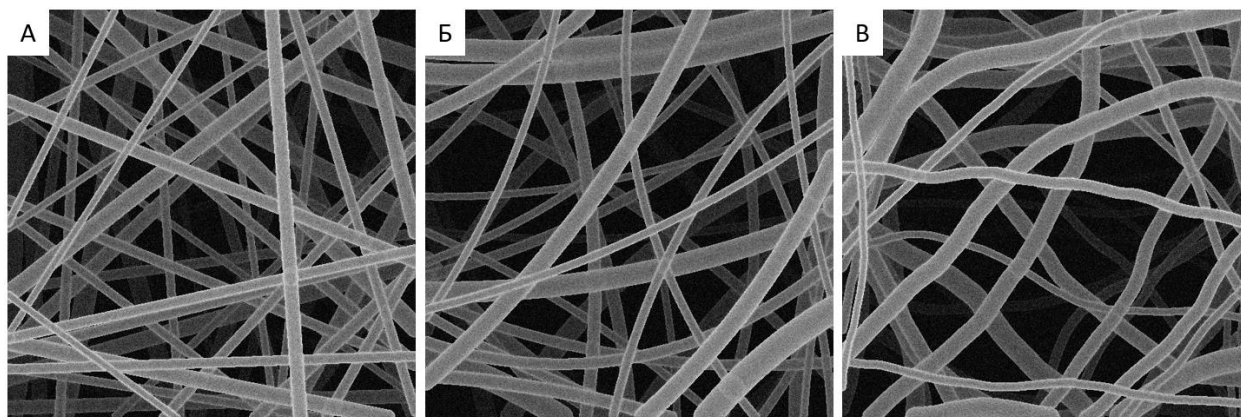


Рисунок 56 – Синтетические СЭМ-изображения мембран, полученные с использованием разработанного алгоритма: А – прямые волокна, Б – волокна в форме дуг, В – волокна, описываемые персистентной моделью.

Итак, в данной главе описана корреляционная микроскопия – методический подход, который позволяет получить изображения одного и того же участка поверхности образца с помощью двух видов микроскопии, СЭМ и КЛСМ. С помощью этого подхода проанализированы волокна из фиброина и желатина, содержащие разные флуоресцентные красители. Показано, что для фиброина данные о диаметрах волокон, получаемые методами СЭМ и КЛСМ, хорошо совпадают, а для желатина расходятся, и это может быть связано со сравнительно большим набуханием желатина в воде. Методический опыт, накопленный в экспериментах по корреляционной микроскопии, может быть перенесен на разные объекты, содержащие флуоресцентные метки.

По z-стекам, полученным методом КЛСМ, были определены верхние точки волокон, соответствующие поверхности, доступной для исследования методом СЭМ. Было показано, что характерная глубина расположения этих точек составляет 1.5-2 мкм, что соответствует 3-4 слоям волокон. Процедура определения верхних точек z-стека, в совокупности с программой для моделирования структуры электроформованных мембран, позволяет создавать синтетические СЭМ-изображения электроформованных мембран, которые могут быть полезны для развития специализированных алгоритмов анализа изображений.

## **4. Многокомпонентные электроформованные мембраны**

*Данная глава основана на материале статей [A20]-[A24]. Вклад автора состоял в планировании работы, разработке концепции экспериментов, проведении некоторых измерений методами СЭМ и КР-микроспектроскопии, измерении смачиваемости мембран, а также в анализе и обработке данных.*

### **4.1. Материалы и методы**

#### **4.1.1. Приготовление смесей и электроформование**

В данной части работы использовали смеси из полиэфиров (ПОБВ, ПЛА) и белков (БСА, желатин), приготовленные в общем растворителе ГФИП. Смесей могли быть гомогенными или гетерогенными (несовместимыми). После перемешивания и длительного (порядка ~1 недели) хранения смеси были либо мутными, либо содержали явную границу раздела фаз. Для электроформования несовместимых смесей их тщательно перемешивали на вортексе непосредственно перед загрузкой в установку для электроформования.

Для построения фазовой диаграммы использовали метод точки помутнения: смешивали компоненты в известном соотношении и инкубировали в течение 24 часов при температуре 25°C. После этого для каждой смеси определяли, является ли она совместимой (прозрачной), или компоненты демонстрируют несовместимость (смесь мутная или разделяется на сопряженные растворы).

Электроформование проводили, как описано выше в разделе 2.1.7 Электроспиннинг.

#### **4.1.2. Сканирующая электронная микроскопия и элементный анализ**

Образцы исследовали на сканирующем электронном микроскопе Zeiss Merlin, как описано выше в разделе 2.1.8 Сканирующая электронная микроскопия. Однако в дополнение к получению изображений проводили элементный анализ. Для этого образцы предварительно покрывали углеродом на установке Sputter Coater Q150T, с помощью дугового разряда между двумя углеродными стержнями. Затем при исследовании на СЭМ проводили элементный анализ, регистрируя характеристическое рентгеновское излучение детектором X-MaxN 150 (Oxford Instruments, Великобритания). Измерения проводили при силе тока 0.5-1 нА и ускоряющем напряжении 8-10 кВ. При этих измерениях рабочее расстояние составляло 8.5 мм, в соответствии с рекомендациями производителя оборудования. Спектры рентгеновского

излучения и элементные карты регистрировали с помощью программы AztecEnergy EDX (Version 3.0).

#### **4.1.3. Оптическая микроскопия и КР-микроспектроскопия**

Изображения электроформованных волокон, содержащих флуоресцентно меченый альбумин, получали на широкопольном флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse Ti с использованием объектива Plan Fluor 60x/0.7. Изображения получали с помощью камеры ORCA-Flash4.0 (Hamamatsu, Япония).

Измерения методом КР-спектроскопии проводили на спектрометре ИНТЕГРА Спектра (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия). Использовали зеленый лазер (532 нм), мощность на образце составляла не более 2 мВт. При съемке спектров использовали объектив 100x/0.9, решетка монохроматора содержала 600 штрихов/мм. В качестве детектора использовали ПЗС камеру с электронным умножителем (EM CCD), охлаждаемую до -65°C (Andor, Великобритания).

#### **4.1.4. Измерения краевого угла смачивания**

Краевой угол смачивания измеряли методом лежащей капли – на горизонтально расположенную мембрану помещали каплю жидкости и фотографировали ее во встречном свете. Измерения проводили на установке Drop Shape Analyzer DSA 25E (Kruss, Германия) или на аналогичном самодельном устройстве. Измерения проводили для дистиллированной и деионизованной воды, объем капли составлял 2 мкл. Чтобы зарегистрировать измерения краевого угла смачивания с течением времени, например, впитывание капли в образец, измерения проводили в течение 3 минут с шагом 1 с.

#### **4.1.5. Кинетика растворения мембран**

Чтобы определить зависимость массы мембран от времени, фрагменты мембран с известной массой (обычно в начале эксперимента  $m_{\text{фрагмента}} \sim 15$  мг) помещали в пробирки с водой или фосфатно-солевым буфером и инкубировали в течение различного времени при слабом перемешивании. Затем мембраны извлекали, промакивали фильтровальной бумагой, и измеряли их массу с помощью аналитических весов. Кроме того, в некоторых экспериментах количество белка, вышедшего из мембраны, регистрировали с помощью спектрофотометра: измеряли поглощение раствора при длине волны  $\lambda = 280$  нм и вычисляли концентрацию, исходя из известного коэффициента поглощения (раствор БСА с концентрацией 1 мг/мл имеет  $A_{280} = 0.624$ ).

#### 4.2. Общие замечания об использовании полимер-белковых смесей в электроформовании

Электроформованные мембраны, которые были рассмотрены в предыдущих разделах, являлись однокомпонентными – они состояли из одного полимера. Возможно, в них присутствовали следы растворителя, но ими обычно пренебрегают, т.к. после вакуумной сушки количество растворителя мало, и он слабо влияет на свойства мембран [242]. Чтобы расширить спектр свойств и применений электроформованных мембран, их делают не только однокомпонентными, но и многокомпонентными. В данном случае речь идет не о малой добавке одной из компонент (например, добавки ~1% лекарственного вещества к полимеру-носителю), а об одновременном использовании в электроформовании нескольких полимеров – таких, что технически волокна можно было бы изготовить из каждой компоненты в отдельности. При этом компоненты могут совмещаться послойно [243], [244], за счет электроспиннинга с нескольких независимых игл [245], за счет коаксиального электроспиннинга [246], [247], и за счет электроспиннинга разнообразных многокомпонентных смесей и эмульсий [243], [248], [249]. В последнем случае электроспиннингу подвергается смесь не двух веществ (полимер и растворитель), а многокомпонентная смесь. Такие смеси часто оказываются несовместимыми, т.е. в них наблюдается фазовое разделение.

Допустим, мы намерены изготовить двухкомпонентную мембрану из двух полимеров, и смешиваем их в общем растворителе. Смесь получается мутная, несовместимая, и находится в неравновесном состоянии. Время релаксации  $t_{\text{рел}}$  такой смеси будет велико (порядка нескольких недель, например), из-за высокой вязкости полимеров – и большая разница между временем релаксации и временем электроспиннинга  $t_{\text{напыления}} \sim 1$  ч позволяет воспроизводимо получать мембраны из этой смеси:

$$t_{\text{рел}} \gg t_{\text{напыления}}$$

Очевидно, состав смеси, подвергаемой электроспиннингу, влияет на свойства электроформованной мембраны. Описывать это влияние можно в чисто химических терминах (свойства мембраны как функция состава) или в терминах параметров электроспиннинга и структурных характеристик (например, увеличение напряжения при электроспиннинге ведет к снижению среднего диаметра волокон и увеличению сорбционной емкости). Однако, при приготовлении и анализе свойств

многокомпонентных мембран необходимо также учитывать гомогенность смеси, подвергаемой электроспиннингу.

Проиллюстрируем это на примере задачи изготовления мембраны из смеси полиэфира и белка (ПОБВ и БСА). Для ее приготовления в шприц необходимо загрузить смесь ПОБВ и БСА в общем растворителе – ГФИП. Была использована смесь с соотношением компонент 70:30 и общей концентрацией 6% по массе. Она была непрозрачной, т.е. гетерогенной. Сравним особенности пленки, приготовленной из такой смеси методом полива, со свойствами электроформованной мембраны (в качестве образцов сравнения будем использовать однокомпонентные пленки и мембраны).

На поверхности поливной пленки из смеси ПОБВ и БСА наблюдались округлые области, отличающиеся от окружающего полимера (рисунок 57 А). Диаметр этих областей лежал в диапазоне 5-35 мкм. Можно предложить следующую интерпретацию: при формировании пленки происходило испарение ГФИП, а ПОБВ и БСА разделялись на практически однокомпонентные фазы, и БСА сформировал округлые участки в окружающем его ПОБВ. Эта интерпретация подтверждается двумя экспериментами. Во-первых, ее подтверждают данные рентгеновского микроанализа. В спектрах характеристического рентгеновского излучения, полученных от этих округлых областей, обнаруживается характеристический пик азота (392 эВ, линия K $\alpha$ ), а в основной пленке его нет (рисунок 57 Б, В). Во-вторых, круглые участки быстро вымываются водой, а основная часть пленки остается практически неизменной (рисунок 57 Г). Действительно, БСА – это водорастворимый белок, а ПОБВ в воде нерастворим, и способен долго (несколько месяцев) сохранять свою целостность.

Можно проследить, как присутствие БСА повлияло на зависимость массы пленки от времени (при помещении пленки в воду или буфер). БСА быстро растворялся, и масса пленки снижалась до 70% от исходного значения (рисунок 57 Д). Для аналогичной пленки, изготовленной из чистого ПОБВ (без добавления БСА), такого быстрого снижения массы не наблюдалось – ее масса практически не изменялась в течение времени наблюдения.

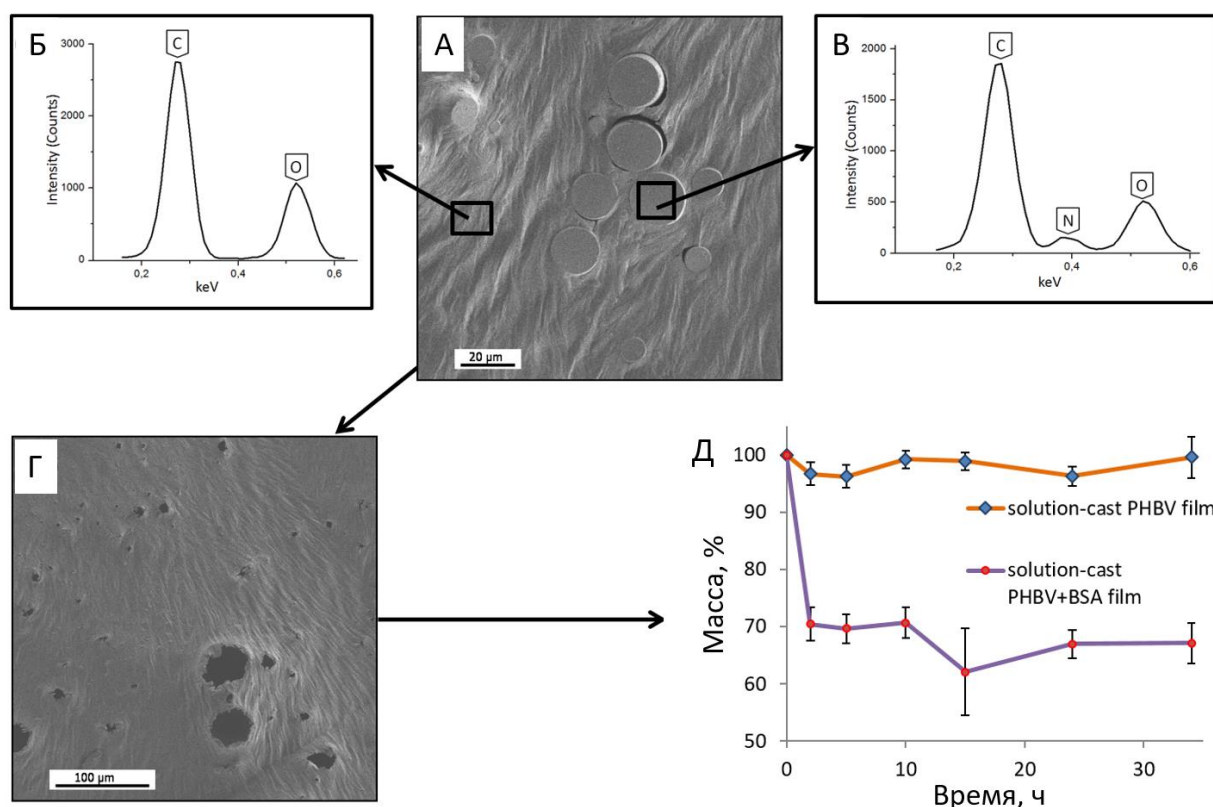


Рисунок 57 – Свойства пленки, приготовленной из смеси ПОБВ и БСА в ГФИП (70:30, общая концентрация 6% по массе). А – СЭМ-изображение пленки, Б и В – рентгеновские спектры двух областей, Г – изображение поверхности после инкубации в воде в течение 2 ч, Д – зависимость массы пленок от времени при их инкубации в воде.

Проследим, какую структуру имеет электроформованная мембрана, изготовленной из этой же смеси ПОБВ и БСА, и сравним ее морфологию с морфологией однокомпонентных мембран, состоящих из ПОБВ или БСА в отдельности. Все обсуждаемые мембраны были приготовлены при одних и тех же условиях электроспиннинга.

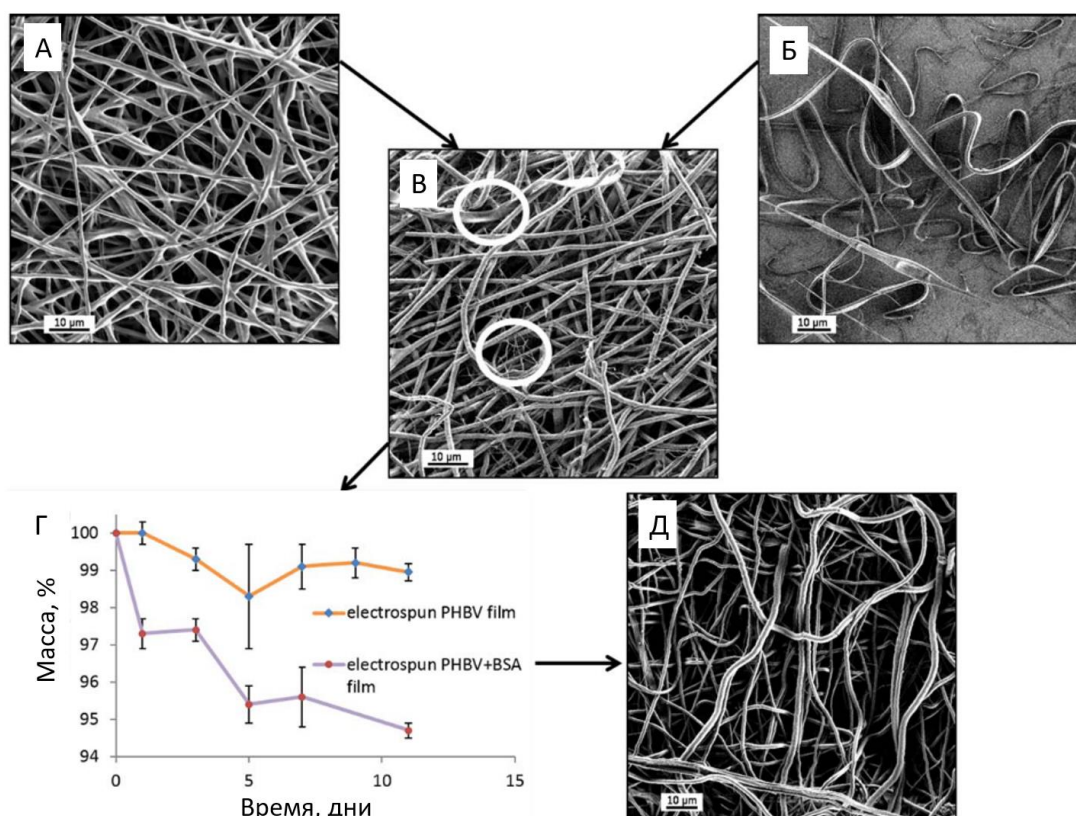


Рисунок 58 – Морфология электроформованных мембран из ПОБВ (А), БСА (Б) и их смеси (В). Зависимость массы мембран от времени при их инкубации в воде (Г). Морфология мембраны после инкубации в воде в течение 7 дней (Д).

Электроформованная мембрана из ПОБВ состояла из волокон цилиндрического сечения со средним диаметром 500 нм (рисунок 58 А), мембрана из БСА (строго говоря, не мембрана, а совокупность волокон на коллекторе, потому что отделить БСА от коллектора практически не удавалось) состояла преимущественно из лент (рисунок 58 Б). В структуре электроформованной мембраны из смеси этих компонент (70:30) наблюдались элементы каждой из этих двух структур – волокна цилиндрического сечения и ленты (рисунок 58 В). Кроме них, мембрана содержала участки тончайшей сети, в которой диаметр волокон составлял менее 50 нм (эти участки и ленты выделены кругами на рисунке 58 В). Можно предположить, что эти структуры обогащены альбумином аналогично тому, как им обогащены округлые области в пленке, изготовленной методом полива (рисунок 57).

Эта гипотеза подтверждается закономерностями растворения мембран (рисунок 58 Г, Д). За 11 дней инкубации в воде электроформованная мембрана из ПОБВ и БСА потеряла ~6% массы, хотя для поливной пленки потеря массы была равна массовой доле БСА и составляла 30% (и происходила очень быстро). Итак, только малая часть БСА, содержащегося в мембране, находится в «легкорастворимом» состоянии, а основная

часть БСА стабилизирована нерастворимым в воде ПОБВ. После инкубации в воде в течение недели (рисунок 58 Д) с поверхности мембраны исчезли ленты и участки тончайшей сети, но основная часть цилиндрических волокон сохранила свою морфологию. По-видимому, БСА распределен внутри них, и в значительной степени «заперт» за счет нерастворимого в воде ПОБВ.

Таким образом, из смеси полимера и белка, приготовленной в общем растворителе, можно изготовить сплошную пленку методом полива или электроформованную мембрану. Термодинамическая несовместимость компонент более явно проявляется в случае поливной пленки, чем в случае мембраны. В следующем разделе описаны некоторые практически важные свойства мембран, изготовленных из полимер-белковых смесей, которые подталкивают исследователей к изучению таких систем.

#### 4.3. Растворимость и смачиваемость мембран, изготовленных из полимер-белковых смесей

Допустим, что мембрану, изготовленную из смеси нерастворимого в воде полимера и растворимого белка, поместили в воду или буфер. Масса этой мембраны снижается с течением времени – и такое снижение можно рассматривать с двух точек зрения. Если сосредоточиться на полимере, то смесевая мембрана деградирует быстрее, чем «контрольная» мембрана из чистого полимера (рисунок 58 Г). Если же сосредотачиваться на белке, то он, наоборот, растворяется медленно, и это можно использовать для создания волокон, обеспечивающих пролонгированное высвобождение ферментов в раствор [250-252]. Проиллюстрируем это экспериментом по изготовлению мембран из смеси ПЛА и БСА (рисунок 59).

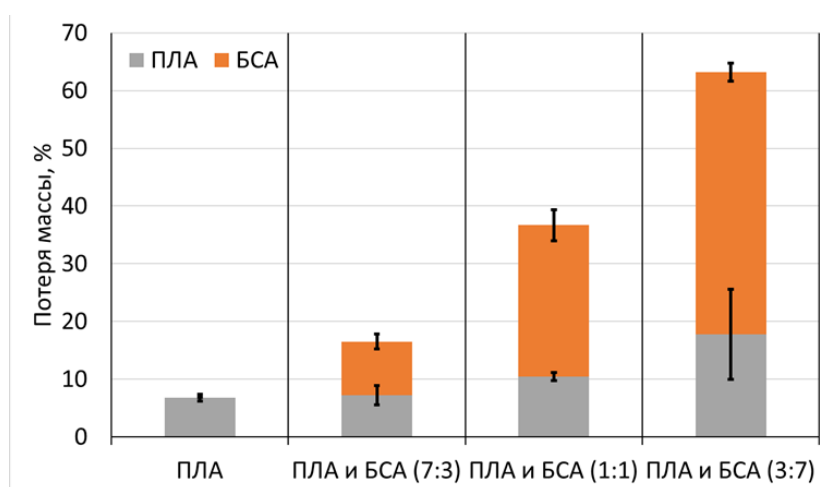


Рисунок 59 – Потеря массы электроформованных мембран из ПЛА и БСА после месяца инкубации в воде. Планки погрешностей отражают среднеквадратичное отклонение.

Мембраны на основе ПЛА (гидрофобная компонента) с различным содержанием БСА (гидрофильная компонента) инкубировали в воде в течение месяца, чтобы проследить влияние содержания БСА на скорость деградации. В воду был добавлен азид натрия, чтобы исключить бактериальную контаминацию. В эксперименте были исследованы мембраны с соотношением ПЛА и БСА, равным 7:3, 1:1, 3:7 и мембраны из чистого ПЛА. Включать в эксперимент мембраны из чистого БСА было нецелесообразно, т.к. они растворялись сравнительно быстро, за десятки минут или часы.

Для таких смесевых мембран можно выделить разные способы потери массы:

$$\Delta m = \Delta m_{\text{ПЛА}} + \Delta m_{\text{БСА}}$$

Во-первых, мембрана может отдавать БСА (изменение массы  $\Delta m_{\text{БСА}}$ ), т.е. терять массу за счет перехода молекул БСА в раствор. Во-вторых, ПЛА может гидролизироваться с образованием водорастворимых олигомеров, как это делает чистый ПЛА (изменение массы  $\Delta m_{\text{ПЛА}}$ ). Чтобы различать эти два механизма, убыль массы регистрировали двумя способами: с помощью весов (при таком измерении  $\Delta m$  оба механизма дают вклад в результат) и путем измерения концентрации БСА в растворе по поглощению раствора при  $\lambda=280$  нм (альбумин поглощает УФ-излучение за счет ароматических аминокислотных остатков, а олигомеры ПЛА его не поглощают). Результаты измерений представлены на рисунке 59. Чем больше была доля БСА в составе мембраны, тем более заметной была потеря массы за месяц. Этот результат ожидаем, т.к. внесение водорастворимой компоненты в состав волокон естественно ускоряет ее деградацию в воде.

Однако в этом эксперименте проявился еще один эффект. Чем больше была доля БСА в составе мембраны, тем больше была потеря массы полилактида  $\Delta m_{\text{ПЛА}}$  за время эксперимента. Вероятно, это связано с тем, что вымывание БСА увеличивает поверхность ПЛА, доступную для контакта с водой и гидролиза. Таким образом, добавление альбумина (или другой водорастворимой компоненты) в состав мембраны может использоваться для того, чтобы регулировать время деградации электроформованной мембраны [253-255].

Описанный эксперимент основан на измерении потери массы в одной временной точке. Проследим, как изменяется масса БСА, высвободившегося из мембраны, с течением времени. В этом эксперименте была использована мембрана, состоящая из

ПЛА и БСА в соотношении (1:1), она была изготовлена из гетерогенной смеси ПЛА, БСА и ГФИП 3:3:94, ее морфология будет описана ниже.

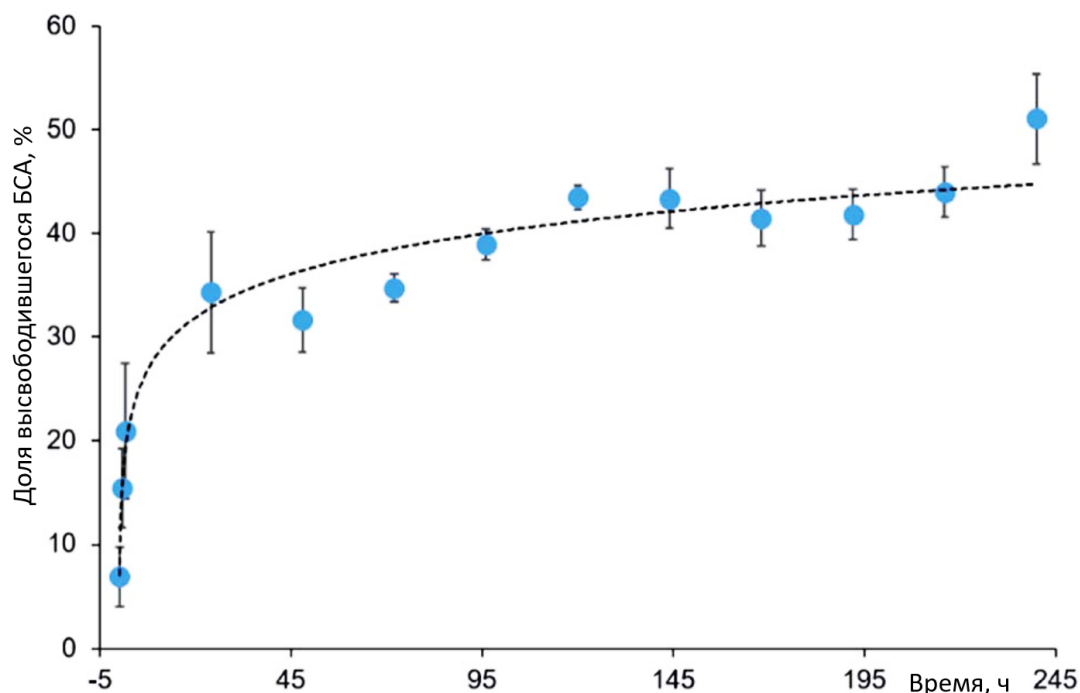


Рисунок 60 – Кинетика высвобождения БСА из мембраны, состоящей из ПЛА и БСА.

За 10 суток из этой мембраны высвободилось приблизительно 50% БСА, причем почти 30% в первые сутки (рисунок 60). Другими словами, в начальный момент времени наблюдался интенсивный выход БСА из мембраны, а затем он замедлился, и за время эксперимента мы наблюдали выход лишь половины содержащегося в мембране белка.

Зависимость массы высвободившегося из мембраны вещества (не только белка, но и низкомолекулярного вещества) от времени может быть описана моделью Пеппаса-Корсмейера [256], [257]. Эта модель изначально была предложена для описания процесса высвобождения водорастворимого лекарства из гидрогелей, имеющих разную степень сшивки. Согласно этой модели, доля высвободившего вещества является степенной функцией времени:

$$\frac{m_{\text{своб}}}{m_0} = kt^n$$

Эту зависимость обычно используют при небольших временах,  $\frac{m_{\text{своб}}}{m_0} < 0.6$ . В этой формуле важен показатель степени  $n$  – в случае диффузии по закону Фика он равен  $n=0.5$  и принимает значения более 0.5 при нефиковской диффузии [257], [258]. Случаи  $n < 0.5$  определяются, по-видимому, взаимодействиями между высвобождающимся веществом

и полимерной матрицей, которые затрудняют диффузию и снижают скорость высвобождения.

В основе зависимости Пеппаса-Корсмейера лежит выражение для массы вещества, высвободившегося путем диффузии из начального резервуара. Если резервуар представляет собой пластину (бесконечную платформу) с толщиной  $L$ , и интересующее нас вещество высвобождается путем диффузии, то теоретическая зависимость  $\frac{m_{\text{своб}}}{m_0}$  от времени имеет вид [259]:

$$\frac{m_{\text{своб}}}{m_0} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(-\frac{(2n+1)^2 \pi^2 D t}{L^2}\right)$$

а при малых временах, используя соотношение  $\sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} = \frac{\pi^2}{8}$ , можно получить

$$\frac{m_{\text{своб}}}{m_0} \approx \frac{4}{L} \sqrt{\frac{D t}{\pi}}$$

Аналогично в случае диффузии из бесконечной нити с радиусом  $R$  решение уравнения диффузии дает соотношение

$$\frac{m_{\text{своб}}}{m_0} = 1 - 4 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{\alpha_n^2} \exp\left(-\frac{D \alpha_n^2 t}{R^2}\right)$$

где значения  $\alpha_n$  – это корни уравнения  $J_0(\alpha_n)=0$ , содержащего функцию Бесселя первого рода нулевого порядка. При малых временах также получаем

$$\frac{m_{\text{своб}}}{m_0} \sim \sqrt{t}$$

Однако аппроксимация экспериментально наблюдаемой зависимости на заметном промежутке времени дает показатель степени  $n \approx 0.45$  (для сферических носителей  $n \approx 0.43$ ) вместо  $n=0.5$ . На практике часто наблюдаются отклонения от  $n=0.5$  [256-258]. Так, для описанной выше мембраны из ПЛА и БСА наблюдался коэффициент  $n=0.23 \pm 0.02$  (коэффициент детерминации  $R^2=0.95$ ). Это может объясняться полидисперсностью носителей, т.е. тем фактом, что волокна имеют разные диаметры. В этом случае зависимость доли высвободившегося вещества от времени представляется в виде суммы нескольких сходящихся рядов (свой ряд для волокон каждого диаметра), и аппроксимация такой суммы степенной функцией может приводить к низкому значению показателя степени  $n < 0.5$  [259].

Итак, внесение белков в состав электроформованных мембран на основе полиэфигов влияет на механизм и скорость их деградации. Кроме управления кинетикой

деградации мембраны, можно использовать гидрофильную белковую компоненту для управления смачиваемостью. Рассмотрим это на примере электроформованной мембраны из ПОБВ. Сам по себе ПОБВ является гидрофильным полимером, и его краевой угол смачивания, измеренный на поверхности пленки, изготовленной методом полива, составляет приблизительно  $75^\circ$ . Однако электроформованная мембрана из него имеет краевой угол смачивания приблизительно  $120^\circ$  (рисунок 61). Аналогичное увеличение краевого угла смачивания при переходе от сплошной поливной пленки к электроформованной мембране описано для разных полиэфиров: ПОБ [260], смеси ПОБ с ПОБВ [261] и ПЛА [262]. Исключением из этой закономерности является, наверное, только полидиоксанон – о нем пойдет речь ниже в главе 6. Гидрофобность электроформованной мембраны в общем случае объясняется тем, что капля жидкости, помещённая на ее поверхность, контактирует не только с волокнами, но и с воздухом в порах. Если моделировать мембрану системой параллельных волокон с радиусом  $r$ , расположенных на расстоянии  $d$  между их осями, и к такой системе применить модель Кэсси-Бакстера, то краевой угол смачивания  $\theta_{CB}$  можно вычислить, используя формулу [263-265]

$$\cos\theta_{CB} = \frac{2r}{d}(\pi - \theta_f)\cos\theta_f + \frac{2r}{d}\sin\theta_f - 1$$

В этой формуле  $\theta_f$  – это угол смачивания сплошной пленки из того же материала, из которого изготовлены волокна. Очевидно, при увеличении доли поверхности, занятой порами, т.е. при снижении соотношения  $r/d$ , получим  $\cos\theta_{CB} \rightarrow -1$ , что соответствует предельно гидрофобной поверхности.

Если на этапе электроформования добавить в состав гидрофильную компоненту (БСА), то мембрана, сформированная из смеси, оказывается способной впитывать воду (рисунок 61). Способность к впитыванию воды резко отличает смесевую мембрану от однокомпонентной. Хотя для однокомпонентной мембраны наблюдалось слабое снижение краевого угла смачивания с течением времени ( $\sim 10^\circ$  за 3 минуты), оно объяснялось, прежде всего, высыханием капли – аналогичное снижение можно было наблюдать и на стекле.

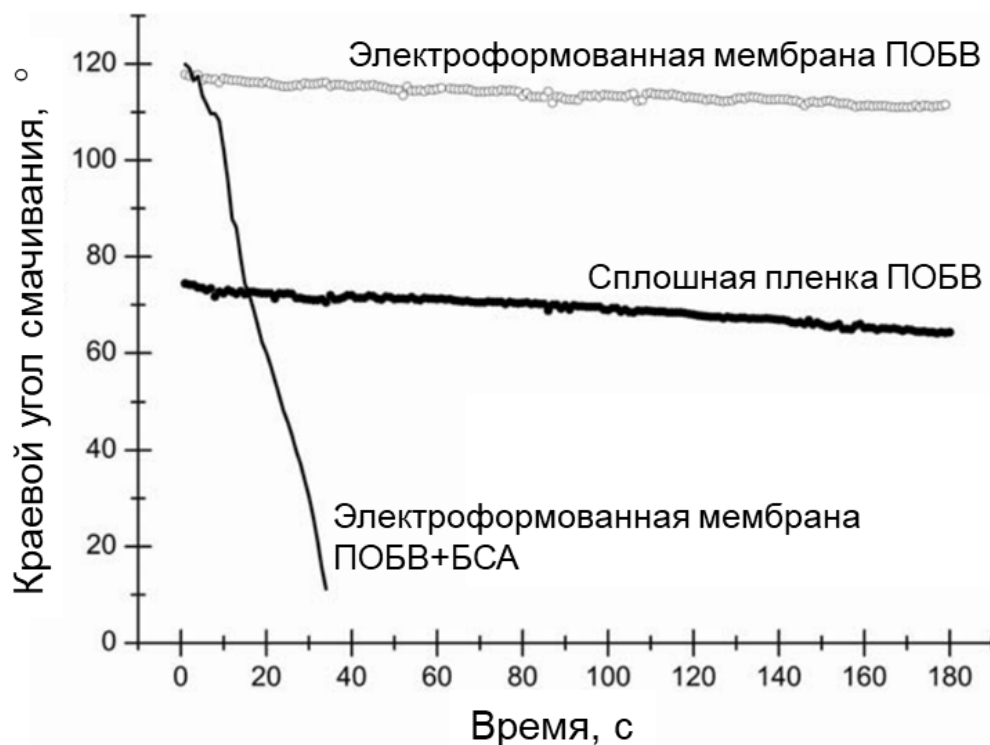


Рисунок 61 – Зависимости краевого угла смачивания от времени для электроформованных мембран различного состава (ПОВВ и смеси ПОВВ и БСА, 7:3), а также для сплошной пленки ПОВВ, изготовленной методом полива.

Описанный пример показывает, что внесение гидрофильной компоненты (БСА) в состав гидрофобной мембраны может использоваться для гидрофилизации поверхности. Это не универсальный способ, например мембраны из ПЛА при добавлении в их состав 10% желатина становились не более гидрофильными, а наоборот, более гидрофобными [A24]. Тем не менее, вместе с описанными выше возможностями ускорения деградации, это иллюстрирует возможность регулировки свойств электроформованных мембран путем вариации их состава и использования смесевых мембран вместо однокомпонентных.

На смесевые мембраны, обсуждаемые в данном подразделе, можно посмотреть с точки зрения тканевой инженерии. Если в состав мембраны, сделанной на основе биоразлагаемого полимера, вносят белковую компоненту, то это обычно делают для достижения одной из двух целей (это обсуждалось в разделе 1.2.2 в литературном обзоре). Белковая компонента может придавать мембране специфические функциональные свойства, например, стимулировать расположенные на ней клетки к дифференцировке в определенном направлении [154], [155]. Кроме того, она может улучшать клеточную адгезию – для этого в состав волокон часто вносят желатин или коллаген [144], [145], [245]. Рассматриваемая в данном подразделе белковая добавка

(БСА) не описывается ни одним из этих двух сценариев, потому что БСА является транспортным белком. Использование его в качестве структурного белка является примером тканевой инженерии в наиболее смелой интерпретации, т.к. мы стараемся с помощью определенной технологии (электроформования) сделать биоподобные структуры, подменяя биологическую функцию БСА. Например, описано использование электроформованного БСА для культивирования кардиомиоцитов и моделирования сердечной ткани [168].

Перейдем к вопросу о структуре смесевых волокон и мембран. Впервые он был сформулирован, по-видимому, в работе [266] на примере мембран из смеси поливинилпирролидона и ПЛА в дихлорметане. В общем случае термодинамически несовместимые компоненты А и В могут располагаться в волокнах одним из трех способов (рисунок 62). Во-первых, они могут быть разделены в пространстве, т.е. одни волокна содержат компоненту А, а другие – компоненту В. Во-вторых, волокно может содержать домены, обогащенные одной или другой компонентой, и в этом случае вдоль волокна такие домены будут чередоваться. В-третьих, в волокне могут быть совмещены обе компоненты. Естественно предположить, что, когда в процессе электроформования экспериментальная система формирует волокна одного из этих типов, в дальнейшем они не изменяются, потому что после удаления растворителя система стабильна. Однако возникает вопрос о том, как эти варианты структуры зависят от фазового разделения, происходящего в смеси полимеров, подвергаемой электроформованию. Ответу на этот вопрос будет посвящена оставшаяся часть данной главы.

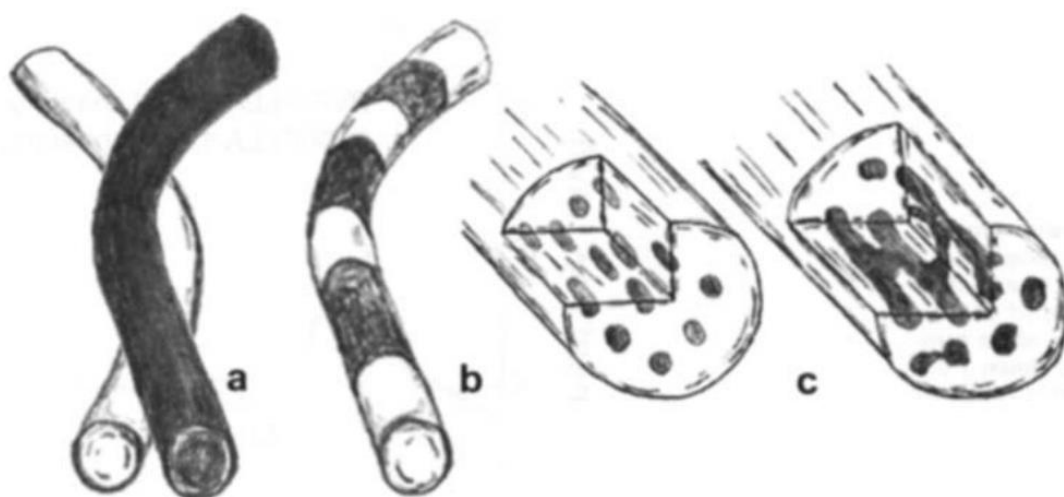


Рисунок 62 – Качественные схемы расположения двух компонент в составе электроформованных волокон: а – каждой волокно состоит из одной компоненты, б – чередующиеся компоненты в составе волокна, в – совмещение компонент в составе волокна. Из статьи [266].

#### 4.4. Взаимосвязь между составом полимер-белковых мембран и их структурой

Для исследования взаимосвязи между фазовым разделением в смеси полимеров в общем растворителе и структурой волокон, изготовленных из этой смеси, была выбрана система из полиэфира (ПЛА) и белка (БСА, он состоит из 583 аминокислотных остатков) в общем растворителе, ГФИП. Степень полимеризации ПЛА, использованного в работе, не измеряли экспериментально, но исходя из типичных значений молекулярной массы ПЛА, используемого для 3D-печати (50 000-140 000 [267]), можно ее оценить как  $N \sim 500-1500$ .

Нами была построена фазовая диаграмма трехкомпонентной системы «ПЛА-БСА-ГФИП» при температуре 25°C (рисунок 63). Каждая точка на этой диаграмме соответствует смеси, которая может быть либо однородной (прозрачной), либо неоднородной (мутной или с явной границей раздела фаз). Смеси являются однородными в одном из двух случаев – либо концентрация растворителя велика (вблизи левого нижнего угла), либо один из полимеров резко превосходит другой по концентрации (вблизи нижней оси растворы ПЛА в ГФИП без БСА, а вблизи левой наклонной оси растворы БСА в ГФИП без ПЛА).

Серая линия на диаграмме проходит по границе области, в которой расположены гомогенные составы, она показывает линию бинодали [268], [269]. В данной работе эта диаграмма важна не с точки зрения термодинамики, а с точки зрения электроформования. Любую смесь, состав которой представлен точкой на диаграмме, можно поместить в шприц установки для электроформования и сделать попытку изготовления волокон. Проследим, как изменяется морфология мембран, которые формируются из различных смесей, при вариациях общей концентрации и соотношения компонент.

Выше в разделе 2.5 было показано, что для растворов ПЛА в ГФИП наблюдается следующая закономерность: при увеличении концентрации ПЛА в растворе в результате электроформования формируются сначала «бусины на нити», затем волокна цилиндрического сечения, а затем ленты (рисунок 44 выше). Если смотреть на эту закономерность с точки зрения фазовой диаграммы (рисунок 63), то увеличение концентрации ПЛА соответствует движению вдоль нижней стороны треугольника (доля ГФИП снижается, концентрация БСА остается равной нулю).

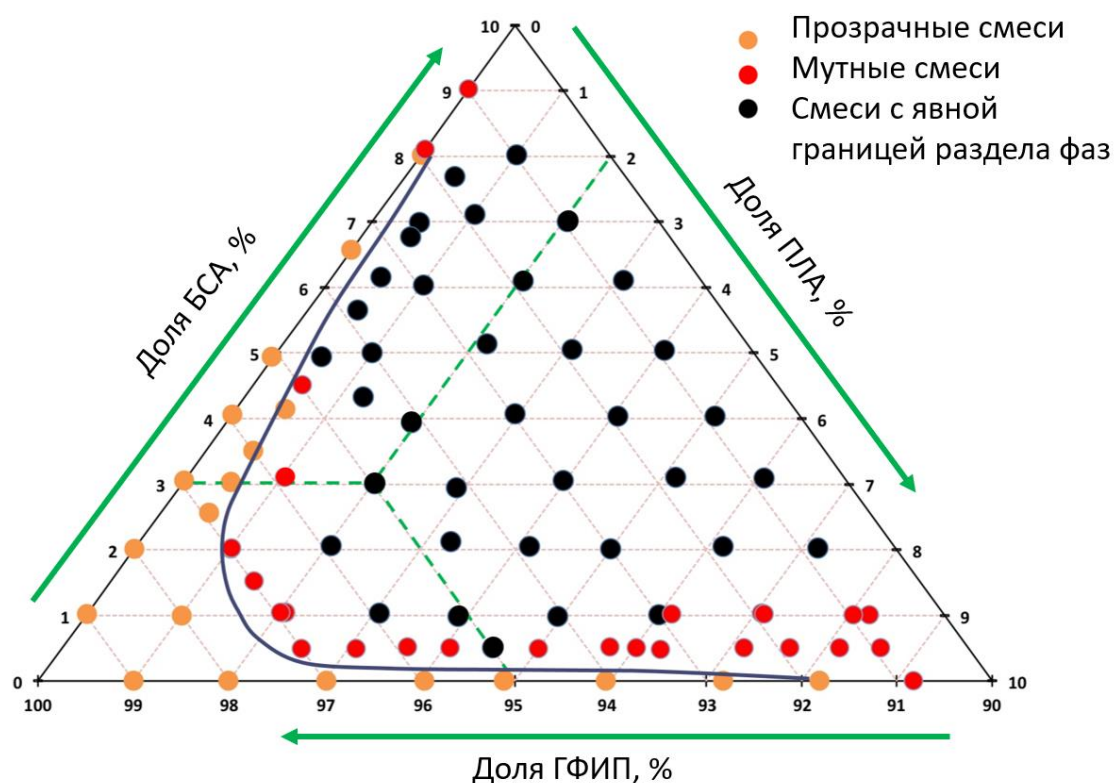


Рисунок 63 – Фазовая диаграмма трехкомпонентной системы «ПЛА-БСА-ГФИП». Пунктирные линии проведены от смеси с составом 3% БСА, 2% ПЛА, 95% ГФИП.

Проследим аналогичную зависимость морфологии волокон от концентрации раствора для БСА, которая соответствует другой стороне фазовой диаграммы (рисунок 64). При концентрации БСА вплоть до 4.5% в результате электроспиннинга формируются не волокна, а гранулы, причем они часто имели сплюсненную форму. Их минимальный диаметр составлял приблизительно 100 нм, а максимальный увеличивался от 2.5 мкм при концентрации 1.5% до 10 мкм при концентрации 4.5%.

При концентрации 4.5% многие гранулы оказываются сцеплены между собой протяженными структурами – лентами. Стабильное формирование лент наблюдается при концентрации раствора, равной 6%. Очевидно, при низких концентрациях наблюдается не электроспиннинг, а электроспрей – струя раствора фрагментируется, и при испарении растворителя формируется не непрерывная нить, а отдельные гранулы. При увеличении концентрации появляются ленты, причем стадия формирования волокон цилиндрического сечения практически отсутствует; они встречаются на изображениях очень редко. Количественный анализ размеров лент затруднён (для них необходимо измерять не один, а два поперечных размера), поэтому ограничимся качественным описанием: при увеличении концентрации раствора БСА в ГФИП наблюдается переход от гранул к лентам, практически минуя стадию формирования

цилиндрических волокон. У некоторых лент удавалось увидеть концы и измерить длину, их длина увеличивалась от 100 мкм при концентрациях раствора 4.5% и 6% до 500 мкм при 7% и 600 мкм при 8%, а при более высоких концентрациях большая длина и запутанность лент затрудняли измерения.

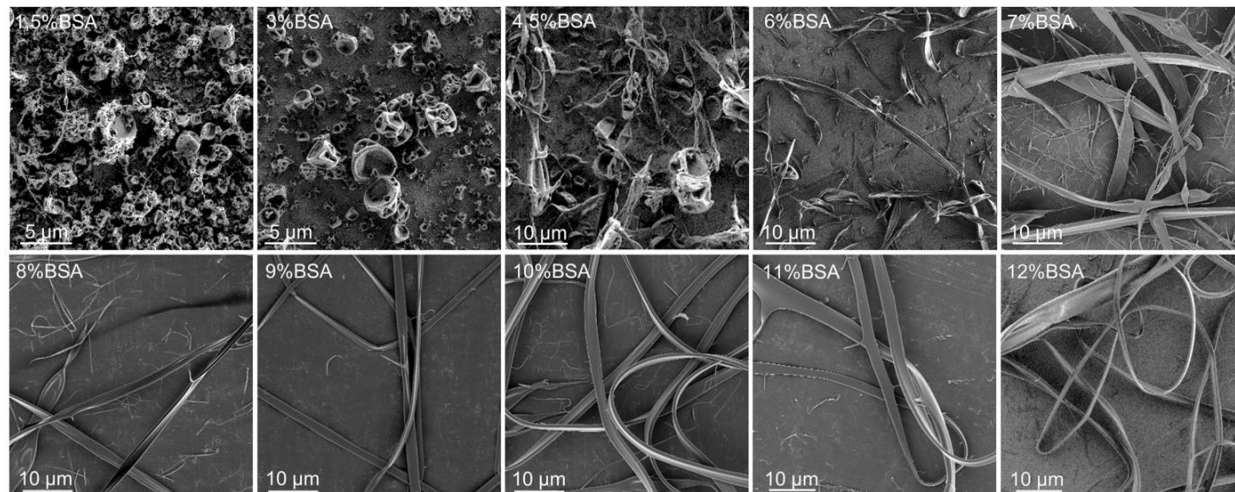


Рисунок 64 – Зависимость морфологии электроформованных волокон БСА от концентрации раствора, использованного при электроспиннинге.

Итак, в случае БСА стадия цилиндрических волокон практически отсутствовала, а тенденция к формированию лент была очень явной. Оба описанные эксперимента (для ПЛА и для БСА) соответствуют движению по одной из осей диаграммы. А как поведет себя морфология мембран, если мы будем менять состав раствора, используемого для электроформования, двигаясь не по оси диаграммы, а в центральной части? Чтобы ответить на этот вопрос, были изготовлены электроформованные мембраны из растворов, составы которых расположены на биссектрисе одного из углов треугольника (рисунок 65). Оказалось, что принципиальная закономерность осталась неизменной: при малой концентрации (0,5% ПЛА и 0,5% БСА, 99% ГФИП) наблюдались бусины на нити, затем количество бусин снижалось, появлялись цилиндрические волокна и росло количество лент. Средний диаметр цилиндрических волокон монотонно увеличивался от  $50 \pm 10$  нм при самой низкой исследованной концентрации (0,5% ПЛА и 0,5% БСА) до  $270 \pm 200$  нм при самой высокой (6% ПЛА и 6% БСА). Цилиндрические волокна сосуществовали при низких концентрациях с бусинами, а при высоких – с лентами. При суммарной концентрации ПЛА и БСА 6% и более ленты было легко обнаружить, а бусины, наоборот, не наблюдались.

Таким образом, описываемая закономерность (гранулы, бусины на нити, цилиндрические волокна, ленты) наблюдалась как для гомогенных, так и для гетерогенных смесей, подвергаемых электроформованию.

В какой мере обнаруженные качественные закономерности могут быть перенесены на другие полимеры и смеси? Судя по всему, она имеет практически универсальный характер и применима для широкого круга объектов. Действительно, исчезновение бусин при увеличении концентрации раствора описано для многих систем (полистирола [270], ПММА [271], ПКЛ [272], фиброина шелка [273] и ПЛА [221], [273], [274]. Это часто объясняется тем, что бусины (или отдельные гранулы) формируются при недостаточном количестве полимера (которое в пределе может вести к низкой вязкости и распаду струи на отдельные капли). Переход от цилиндрических волокон к лентам, который происходит при увеличении концентрации, также описан для многих полимеров – желатина [275], поливинилацетата, фиброина шелка, нейлона-6 и других. Этот же переход может быть спровоцирован увеличением напряжения между иглой шприца и коллектором. На качественном уровне можно предположить, что и увеличение концентрации раствора, и увеличение напряжения приводят к повышению удельной поверхностной плотности заряда на струе раствора.

Описанные эксперименты важны с технологической точки зрения. Допустим, нам необходимо изготовить электроформованную мембрану из двух термодинамически несовместимых компонент. Чтобы раствор был достаточно вязким, концентрацию необходимо поднимать – и при этом мы, скорее всего, попадем в область термодинамической несовместимости компонент и будем работать с гетерогенной смесью. На примере смесей ПЛА и БСА в ГФИП показано, что это не препятствует электроформованию, и на качественном уровне при использовании смесей сохраняются те же закономерности, что и при электроформовании раствора одного гомополимера в растворителе.

В то же время остается открытым вопрос о пространственном распределении компонент в волокнах, который обсуждался в литературном обзоре. Как в волокнах распределены две несовместимые компоненты: они совмещены в одном волокне, или одни волокна обогащены одной компонентой, а другие другой? Для ответа на этот вопрос необходимо использовать методики, которые позволяют оценить химический состав отдельных волокон.

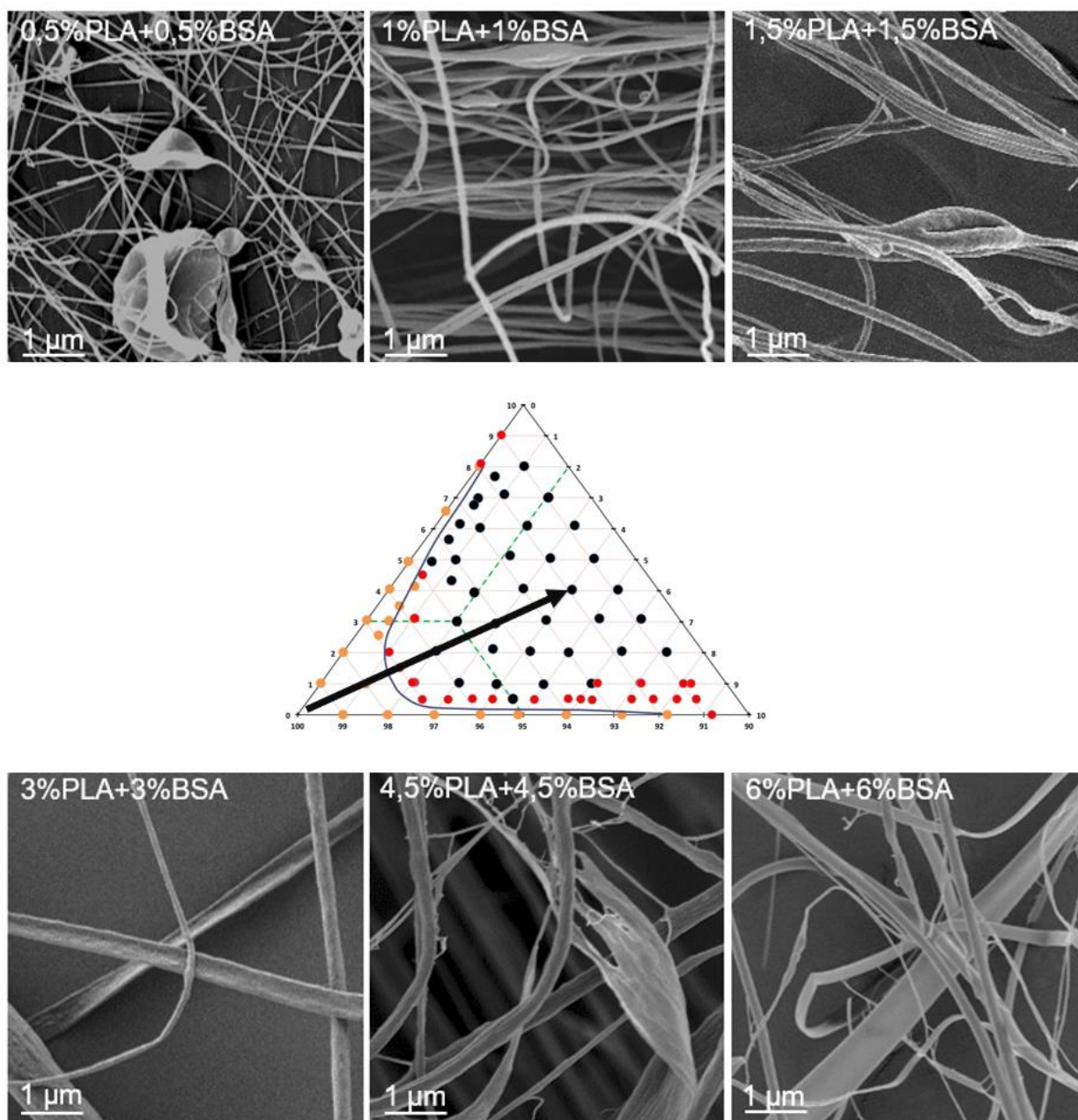


Рисунок 65 – Влияние состава на морфологию электроформованных мембран. Показаны СЭМ-изображения двухкомпонентных мембран, сформированных из смесей ПЛА и БСА в общем растворителе ГФИП, составы которых расположены на черной стрелке на диаграмме.

#### 4.5. Однородность электроформованных полимер-белковых волокон и контроль их химического состава

Для того чтобы исследовать распределение компонент в отдельных волокнах, была выбрана экспериментальная система ПЛА-БСА-ГФИП в соотношении 3:3:94. В структуре мембраны, полученной из такой смеси, обнаруживались как волокна цилиндрического сечения, так и ленты (рисунок 65). В равновесном состоянии это

гетерогенная смесь с явной границей раздела фаз, и перед загрузкой в шприц ее интенсивно перемешивали. На каждом из этапов электроспиннинга (и в шприце, и в струе, и в волокнах) соотношение полимера и белка в среднем составляло 1:1, но каковы локальные вариации этого соотношения? Прежде всего, покажем, что количество белка в каждом волокне отлично от нуля. Для этого можно использовать два подхода – флуоресцентную микроскопию и рентгеновский микроанализ в СЭМ.

Для исследования методом флуоресцентной микроскопии использовали БСА, меченый родамином Б, и добавляли его 20% от общего количества БСА. При этом состав смеси можно записать так: ПЛА-БСА-БСА<sub>флуор</sub>-ГФИП в соотношении 3 : 2.4 : 0.6 : 94, но при этом химические свойства БСА и флуоресцентно меченого БСА можно считать одинаковыми. Предполагается, что флуоресцентная метка не влияет на расположение молекул БСА, и мы получаем возможность отследить их по флуоресцентному сигналу (рисунок 66). При сопоставлении изображения, полученного в проходящем свете, и флуоресцентного изображения, видно, что все волокна светятся, а значит, содержат БСА. Это нетривиальный результат – если бы БСА присутствовал в одних волокнах и отсутствовал в других, то мы бы наблюдали явные скачки интенсивности флуоресценции, например, некоторые волокна отсутствовали бы на флуоресцентном изображении.

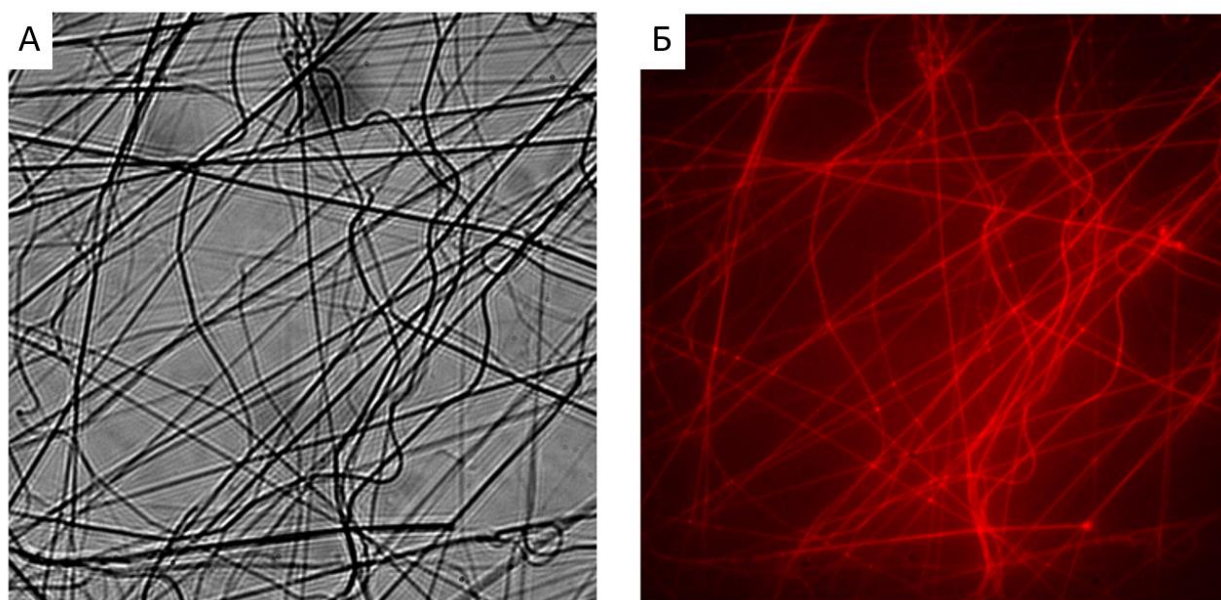


Рисунок 66– Изображения волокон, состоящих из смеси ПЛА и БСА, содержащих флуоресцентно меченый БСА. А – изображение в проходящем свете, Б – флуоресценция. Размер поля зрения 222 x 222 мкм.

Аналогичный вывод может быть получен с помощью рентгеновского микроанализа аналогично тому, как это было сделано для системы ПОБВ-БСА (раздел

4.2 выше). Для этого эксперимента не нужен флуоресцентный краситель; исследование проводили на редко расположенных волокнах, чтобы при измерениях методом РМА можно было собирать сигнал от отдельного волокна (рисунок 67). Малая поверхностная плотность волокон на коллекторе была достигнута малым временем напыления (высокое напряжение включали на 1-2 с).

В ходе эксперимента методом СЭМ были выбраны отдельные волокна и ленты, а затем получены элементные карты (распределения элементов) от соответствующих участков поверхности образца. Оказалось, что слабый сигнал азота можно было зарегистрировать от каждого исследованного волокна. Это подтверждает присутствие БСА в каждом волокне, т.к. азот входит в его состав и отсутствует в ПЛА.

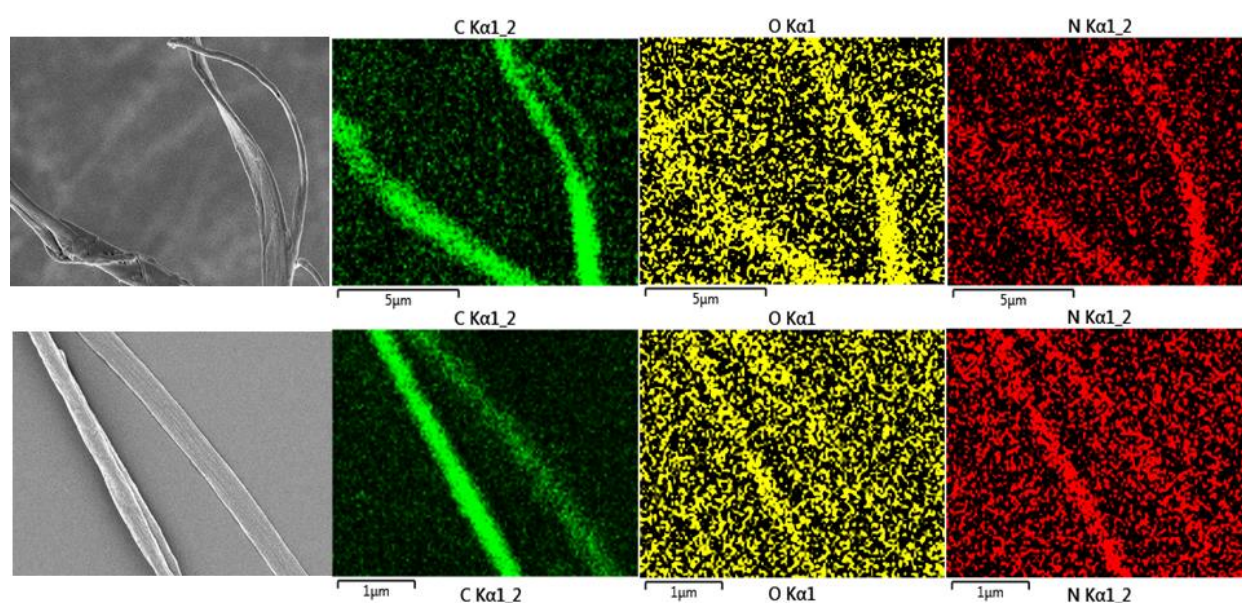


Рисунок 67 – Исследование элементного состава электроформованных волокон. Верхний и нижний ряды соответствуют двум участкам поверхности образца. Слева направо: СЭМ-изображение, карта распределения углерода, карта распределения кислорода, карта распределения азота.

В контрольных экспериментах, выполненных с отдельными волокнами ПЛА и с отдельными волокнами БСА обнаруживались ожидаемые наборы элементов: углерод и кислород обнаруживались и в ПЛА, и в БСА, а азот – только в БСА (рисунок 68). При этом ПЛА формировал цилиндрические волокна, а БСА – ленты.

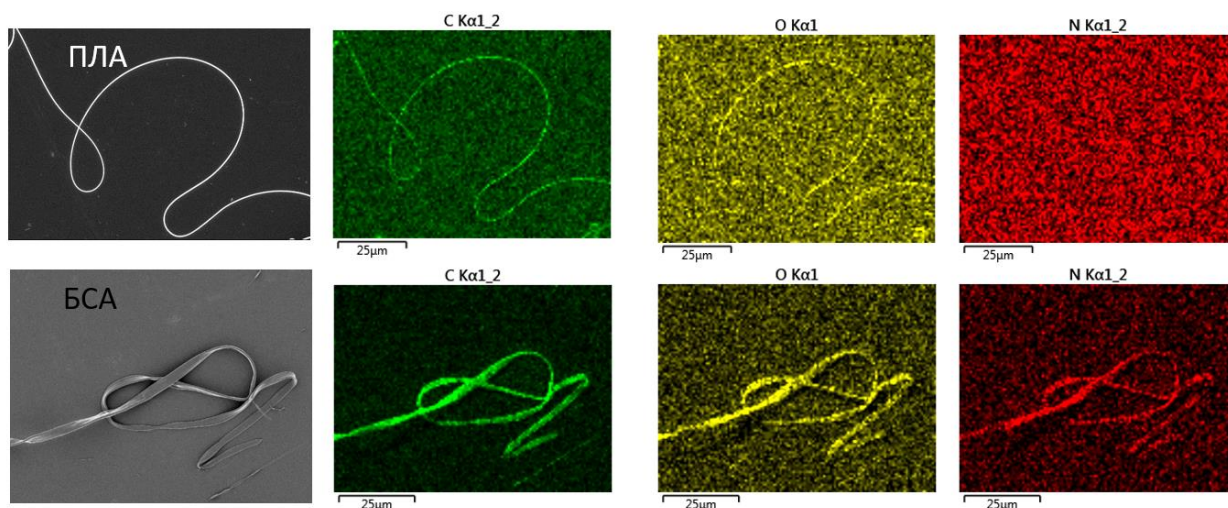


Рисунок 68 – Результаты элементного анализа однокомпонентных электроформованных волокон, изготовленных из ПЛА (верхняя строка) и БСА (нижняя строка).

В этих экспериментах сигнал азота был очень слабый, а карты его распределения получались зашумленными. Оценим массовую долю азота  $\alpha_N$  в таком образце. Количество атомов азота в одной молекуле БСА составляет  $n_N=816$  (вычислено программой ProtParam). Массовая доля азота может быть рассчитана как

$$\alpha_N = \alpha_{BSA} \frac{n_N \cdot M_N}{M_{BSA}}$$

В этой формуле  $M_N=14$  а.е.м.,  $M_{BSA} \approx 66\,500$  а.е.м., а  $\alpha_{BSA}$  – массовая доля БСА в волокне (1 для чистого волокна или 0,5 для смеси, показанной на рисунке 67). По этой формуле получаем  $\alpha_N \approx 0,17$  для чистого БСА или  $\alpha_N \approx 0,086$  для его смеси с ПЛА.

Формально эти значения заметно выше, типичного порога детекции элемента методом РМА, который составляет чем  $\sim 0.1\%$  [276]. Тем не менее, азот относится к легким элементам, его характеристический пик ( $K\alpha$  392 эВ) зажат между пиками углерода и кислорода ( $K\alpha$  277 эВ и  $K\alpha$  525 эВ), и при исследовании тонких образцов, таких как одиночные электроформованные волокна, наблюдался очень слабый сигнал (рисунки 67, 68).

Оба приведенные метода (флуоресцентная микроскопия и РМА) подтверждают, что в каждом из исследованных волокон присутствует БСА – одна из двух несовместимых компонент. Однако, для более полного исследования необходим метод, который позволит детектировать не одну, а обе компоненты. Таким методом является КР-спектроскопия. В качестве образцов для исследования методом КР, как и для РМА, использовали электроформованные волокна, редко расположенные на коллекторе.

Чтобы выбрать удобный для исследования участок волокна и сфокусироваться на нем, была разработана следующая процедура:

1. Получить изображение выбранного участка образца в отраженном свете (рисунок 69 А). В качестве источника света используется белый диод, в качестве детектора – веб-камера. На этом этапе мы выбираем не только исследуемую область, но и приблизительно (грубо) настраиваем фокус.

2. Провести картирование сигнала рэлеевского рассеяния – в этом режиме в качестве источника используется лазер, он сфокусирован в плоскости образца, и осуществляется сканирование по поверхности, причем от каждой точки прибор регистрирует рэлеевское рассеяние с помощью фотоэлектронного умножителя (рисунок 69 Б). Этот процесс медленнее, чем получение изображения в отраженном свете на шаге 1, но несравненно быстрее, чем съемка спектров от каждой точки выбранной области.

3. Лазерное пятно располагается на выбранном волокне, и прибор переводится в режим регистрации спектров. При малом времени накопления спектра ( $\sim 0.5$  с) можно точно настроить фокус, чтобы интенсивность пиков КР-спектра была максимальна.

4. Прибор переводится в режим регистрации спектров с накоплением – можно получить несколько спектров и усреднить, чтобы добиться оптимального соотношения сигнал/шум (рисунок 70). Этот шаг можно повторить на нескольких близко расположенных точках, при необходимости возвращаясь к шагу 3.

Таблица 3 – Основные шаги для получения КР-спектра от индивидуального электроформованного волокна.

| № | Источник света  | Детектор    | Регистрируемый сигнал | Объект исследования                          |
|---|-----------------|-------------|-----------------------|----------------------------------------------|
| 1 | Белый светодиод | Веб-камера  | Изображение           | Область поверхности ( $\sim 10$ мкм)         |
| 2 | Лазер           | ФЭУ         | Изображение           | Область поверхности ( $\sim 10$ мкм)         |
| 3 | Лазер           | Спектрометр | Зашумленный спектр    | Малая область ( $D \sim 1$ мкм)              |
| 4 | Лазер           | Спектрометр | Информативный спектр  | Выбранная точка с размером ( $D \sim 1$ мкм) |

Технические отличия между перечисленными шагами просуммированы в таблице 3. Размер области, в пределах которой преимущественно формируется КР-

сигнал, можно оценить, исходя из длины волны лазера  $\lambda=532$  нм и апертуры объектива  $NA=0.9$ :

$$D \approx 1.22 \frac{\lambda}{NA}$$

В эту формулу входит коэффициент 1.22, а не коэффициент 0.51, использованный при оценке разрешения конфокального микроскопа в разделе 3.2. Разница объясняется двумя факторами. Во-первых, в эксперименте по КР-спектроскопии важна вся площадь области, в которой собирается сигнал, а не только ее наиболее яркая часть, размер которой определяется через ширину на половине высоты максимума интенсивности [223]. Во-вторых, в экспериментах по КР-спектроскопии не оптимизировали апертуру детектора для наилучшего пространственного разрешения. Для системы, использованной в данной работе, получаем оценку  $D \approx 720$  нм, что сопоставимо с типичным диаметром волокон. Если волокна расположены редко, и между их фрагментами есть обширные области чистой подложки (рисунок 69), то можно быть уверенными в том, что спектры соответствуют отдельным волокнам, а не их группе, как при съемке спектров от мембраны.

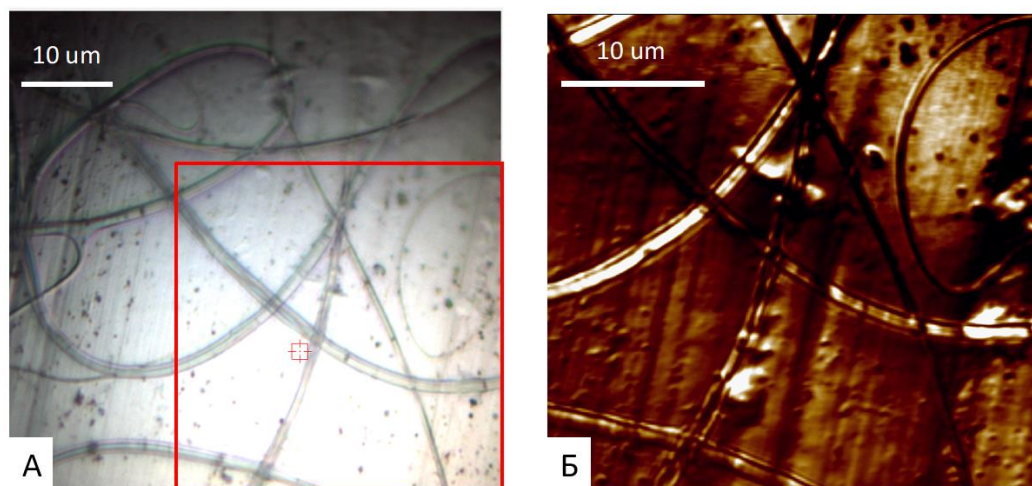


Рисунок 69 – Иллюстрация процедуры выбора поля зрения для получения КР-спектров от одиночных волокон. А – изображение волокон в отраженном свете, Б – изображение выбранного участка, полученное путем картирования интенсивности рэлеевского рассеяния.

Типичные КР-спектры от отдельных волокон из смеси ПЛА и БСА, а также спектры однокомпонентных волокон, полученные в контрольных экспериментах, представлены на рисунке 70. Видно, что спектр, полученный от смесового волокна, содержит пики, каждый из которых присутствует в одном или в обоих спектрах чистых компонент. Наиболее значимые пики каждого из этих спектров представлены в таблице 4.

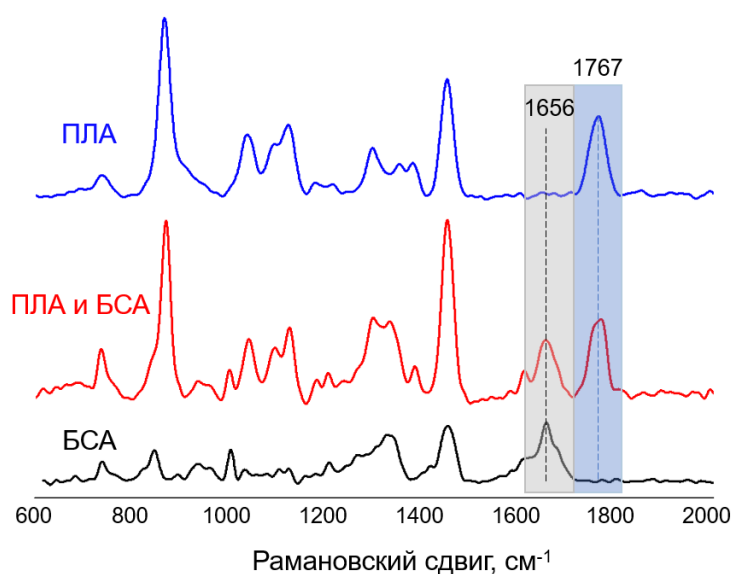


Рисунок 70 – Спектры одиночных электроформованных волокон из ПЛА, БСА и из смеси ПЛА и БСА (1:1). Отмечены характеристические пики 1656 и 1767  $\text{см}^{-1}$ .

Таблица 4 – Наиболее значимые пики в КР-спектрах ПЛА и БСА. Интерпретация сделана по работам [277-281].

| Пик в спектре БСА, $\text{см}^{-1}$ | Интерпретация                                                 | Пик в спектре ПЛА, $\text{см}^{-1}$ | Интерпретация             |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| 737                                 |                                                               | 739                                 | C=O деф.                  |
| 845                                 | тирозин                                                       |                                     |                           |
|                                     |                                                               | 870                                 | C–COO вал.                |
| 935                                 | колебания основной цепи (C-C-N), колебания $\alpha$ -спиралей |                                     |                           |
| 1002                                | фенилаланин и триптофан                                       |                                     |                           |
|                                     |                                                               | 1036                                | C–CH <sub>3</sub> вал     |
|                                     |                                                               | 1092                                | COС сим. вал.             |
|                                     |                                                               | 1126                                | CH <sub>3</sub> деф.      |
|                                     |                                                               | 1294                                | CH деф.                   |
|                                     |                                                               | 1370                                | CH <sub>3</sub> сим. деф. |
| 1450                                | CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> деф.                        | 1450                                | CH <sub>3</sub> деф.      |
| 1655                                | Amide I                                                       |                                     |                           |
|                                     |                                                               | 1765                                | C=O вал.                  |

Некоторые пики, например,  $1450\text{ см}^{-1}$ , присутствуют в спектрах обоих веществ (и ПЛА, и БСА). Спектр ПЛА в целом более четкий, и пики в нем более интенсивные, чем в спектре БСА при тех же условиях съемки; многие из них в спектре БСА не наблюдаются. Спектр БСА содержит слабые пики, и большинство из них перекрываются с пиками ПЛА, но тем не менее можно выделить пики, характеристические для двух рассматриваемых компонент. Наиболее удобными были пики  $\sim 1655\text{ см}^{-1}$  для БСА (колебания пептидной связи, пик Amide I, характерный для белков) и  $\sim 1765\text{ см}^{-1}$  для ПЛА (валентные колебания связи  $\text{C}=\text{O}$ ). При многократном приготовлении образцов (из физически разных растворов, в разные дни и т.д.) и при многократной съемке положения этих пиков смещались на  $1\text{--}2\text{ см}^{-1}$ . Тем не менее, эти пики устойчиво наблюдались во всех полученных спектрах, а в спектрах от смесевых волокон наблюдались оба характеристических пика. Таким образом, КР-спектроскопия подтверждает, что в исследованных волокнах присутствуют обе компоненты. В отличие от описанных выше экспериментов с флуоресцентной микроскопии и РМА, КР-спектроскопия регистрирует не только характеристические особенности БСА, но и характеристические особенности ПЛА.

Аналогичные эксперименты по КР-спектроскопии одиночных волокон, изготовленных из гетерогенной смеси, были проведены для смеси из ПЛА и желатина (рисунок 71). Спектр желатина похож на спектр БСА, и наиболее удобными для анализа пиками снова оказались пики  $1655\text{ см}^{-1}$  и  $1765\text{ см}^{-1}$ . Как и для системы ПЛА-БСА, этот эксперимент подтверждает указанный вывод: обе несовместимые компоненты совмещены в одном волокне. Если рассматривать качественные схемы расположения компонент, то мы приходим к наиболее тесному совмещению компонент (схема на рисунке 62 с).

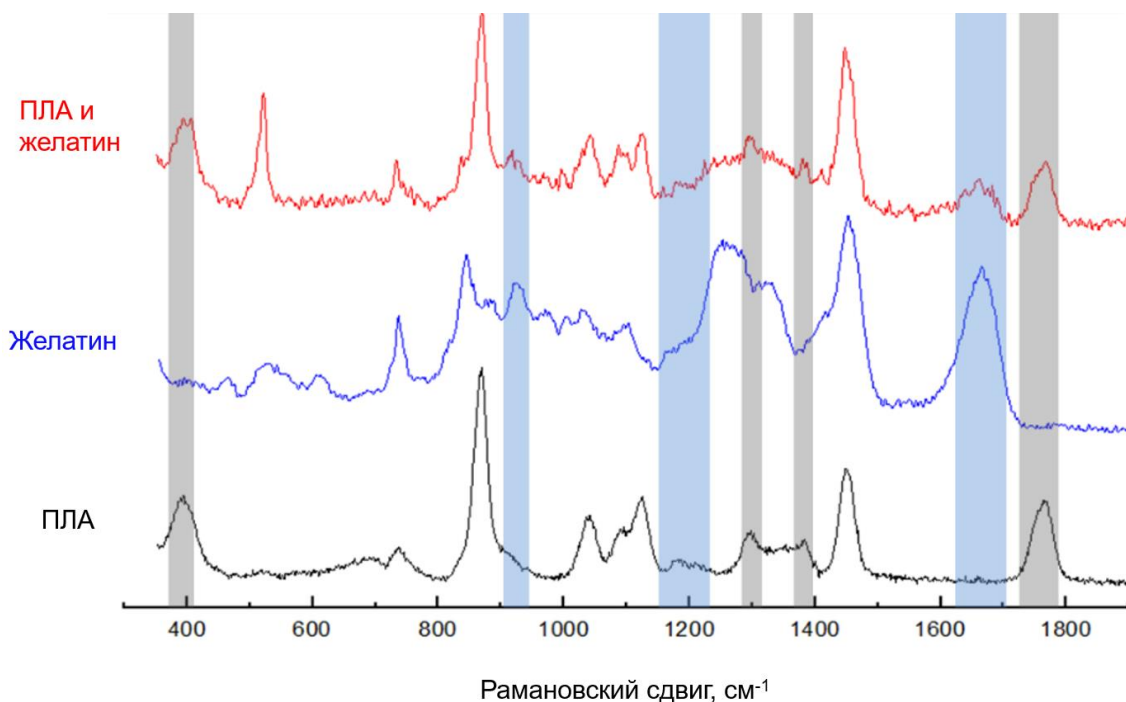


Рисунок 71 – Спектры одиночных электроформованных волокон из ПЛА, желатина и из смеси ПЛА и желатина (1:1). Цветом отмечены характеристические особенности спектров.

Вернемся к волокнам из ПЛА и БСА и попробуем сделать количественный анализ полученных спектров. В основе такого подхода лежит выражение для интенсивности рассеянного света в КР-спектре [279], [282], [283]:

$$I_R \sim \nu^4 I_0 N \left( \frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)^2$$

где  $I_0$  – интенсивность возбуждения,  $N$  – количество рассеивающих центров (функциональных групп) в объеме, от которого мы регистрируем сигнал,  $\nu$  - частота,  $\alpha$  – поляризуемость связи, на которой происходит рассеяние,  $Q$  – амплитуда колебаний. Комбинационное рассеяние наблюдается только в том случае, если происходит изменение поляризуемости, т.е.  $\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \neq 0$ .

В качестве меры соотношения компонент (ПЛА и БСА) используем соотношение интенсивностей пиков:

$$A_{\text{ПЛА-БСА}} = \frac{I_{1765}}{I_{1655}}$$

Предложенное соотношение, очевидно, не равно соотношению концентраций  $C_{\text{ПЛА}}/C_{\text{БСА}}$ . Его значения могут варьироваться при изменении способа вычитания базовой линии из спектров и фильтрации шумов (впрочем, эти процедуры влияют на практически любые результаты количественной обработки КР-спектров). Мы считаем,

что вклад различий поляризуемости в интенсивность характеристических пиков можно считать одинаковым для всех исследуемых образцов. Другими словами, мы считаем, что все интересующие нас химические структуры (пептидные связи для БСА и карбонильные группы ПЛА) во всех молекулах, входящих в состав волокон, имеют одну и ту же конформацию. Это спорное предположение. Например, для ПЛА наблюдаются различия между спектрами аморфной и кристаллической фазы вблизи  $400\text{ см}^{-1}$  [280] и вблизи интересующего нас пика  $1765\text{ см}^{-1}$  [281].

Перечисленные в предыдущем абзаце сложности могут затруднять анализ данных, но не делают его невозможным. Зависимостью интенсивности пиков от кристалличности ПЛА можно пренебречь, т.к. по данным рентгеноструктурного анализа используемый нами ПЛА в электроформованных волокнах является аморфным [A26]. Возможность использовать соотношение пиков  $A_{\text{ПЛА-БСА}}$  как меру соотношения компонент подтверждается аналогичными работами по спектроскопии различных полимеров и белков [279], [284], [285].

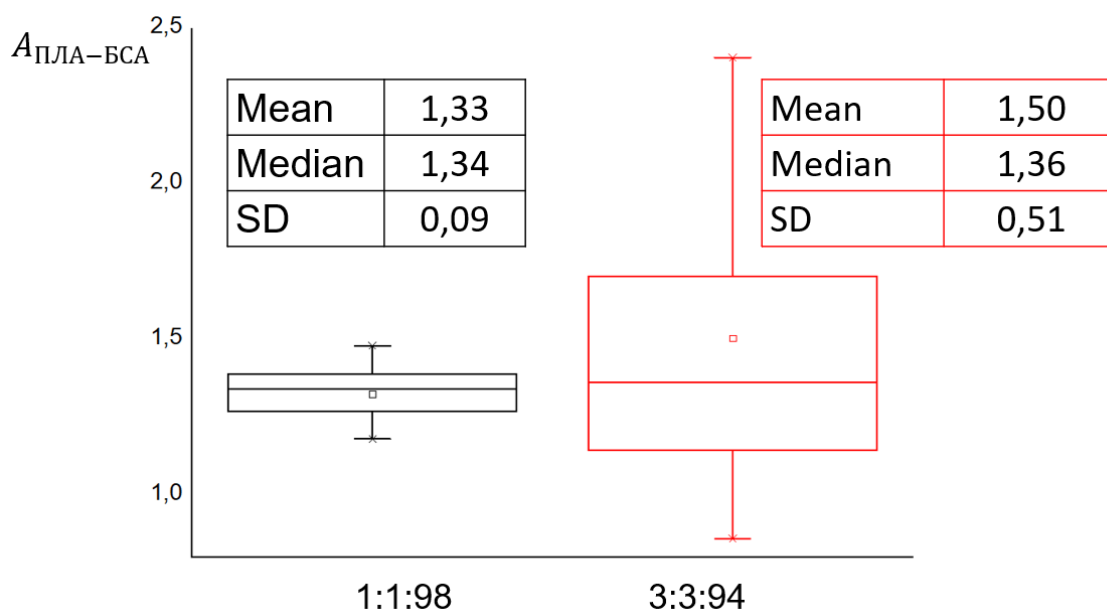


Рисунок 72 – Распределения соотношения  $A_{\text{ПЛА-БСА}}$ , измеренного по данным КР-спектроскопии, в электроформованных волокнах, изготовленных из гомогенной и гетерогенной смеси. Числа у горизонтальной оси показывают соотношение ПЛА, БСА и ГФИП в смеси, использованной для электроспиннинга.

Сравним значения соотношения  $A_{\text{ПЛА-БСА}}$  для волокон, приготовленных разными способами (рисунок 72). Это волокна из смесей ПЛА, БСА и ГФИП в соотношениях 1:1:98 и 3:3:94. Принципиальная разница между мембранами, полученными из этих смесей, состоит в том, что смесь 1:1:98 гомогенна, а смесь 3:3:94 гетерогенна, хотя среднее соотношение ПЛА и БСА в волокнах получается одинаковым (оно составляет

1:1 по массе, а остаточной массой ГФИП мы, как и ранее, пренебрегаем). Изображения электроформованных волокон, полученных из этих смесей, были представлены выше (рисунок 65).

Чтобы получить обсуждаемые данные, КР-спектры получали от индивидуальных волокон, из каждого спектра вычитали базовую линию, удаляли шумы и вычисляли соотношение  $A_{\text{ПЛА-БСА}}$ . В одну выборку включали значения, независимым образом полученные на образцах, приготовленных в разные дни. Медиана соотношения  $A_{\text{ПЛА-БСА}}$  практически не зависит от способа приготовления волокон. При этом значения  $A_{\text{ПЛА-БСА}}$ , полученные от волокон, изготовленных из гетерогенной смеси (3:3:94), имеют несравненно больший разброс, чем аналогичные значения, полученные от волокон, изготовленных из гомогенной смеси (1:1:98). Этот результат интуитивно ясен – в случае гомогенной смеси вариации определяются, прежде всего, незначительными вариациями состава волокна и укладки молекул в нем; в случае гетерогенной смеси разные участки волокон действительно имеют разный состав – одни участки обогащены ПЛА, а другие – БСА.

Итак, при электроспиннинге гетерогенных полимер-белковых смесей необходимо учитывать возможное фазовое разделение компонент. Гетерогенную смесь можно подвергать электроспиннингу и получать воспроизводимую морфологию мембран, если перед загрузкой в шприц ее встряхивать и характерное время возникновения фазового разделения значительно больше времени электроспиннинга. За счет быстрого испарения растворителя электроспиннинг позволяет совместить в одном волокне две несовместимые компоненты. Это было показано тремя аналитическими методами (флуоресцентной микроскопией, РМА и КР-спектроскопией) для ПЛА и БСА, а также методом КР-спектроскопии для ПЛА и желатина. Соотношение характеристических пиков в КР-спектре ( $1655\text{ см}^{-1}$  для БСА и  $1765\text{ см}^{-1}$  для ПЛА) позволяет судить об однородности распределения компонент в волокнах; разброс этого соотношения оказывается больше, если волокна приготовлены из гетерогенной смеси, чем если они приготовлены из гомогенной смеси.

Практическое значение результатов, описанных в этой главе, состоит в том, что включение белков в состав электроформованных волокон значительно расширяет диапазон их свойств, и может использоваться для управления смачиваемостью, временем деградации и другими характеристиками отдельных волокон и волокнистых мембран. Белок БСА, использованный в описанных экспериментах, является модельным объектом вместо более дорогих белков, которые иногда включают в состав

электроформованных волокон. С другой стороны, идея использования белка БСА в качестве структурного элемента является необычным примером придания белку новых, не свойственных ему функций, за счет специфической физической обработки.

## 5. Формирование ориентированных мембран

*Данная глава основана на материале статей [A25]-[A28] и [A34]. Вклад автора состоял в разработке концепции экспериментов, руководстве измерениями методами СЭМ и КЛСМ, а также в анализе и обработке данных.*

### 5.1. Материалы и методы

#### 5.1.1. Электроформование

В данном разделе описаны эксперименты, выполненные с мембранами из ПЛА (Res, Россия и Sigma, США), нейлона-6 (Sigma, США) и ПКЛ (Полиморфус, Россия). Электроформование проводили как описано выше в разделе 2.1.7, однако в некоторых экспериментах в качестве коллектора использовали пару параллельных лезвий (рисунок 73). Ориентированные волокна, сформированные между лезвиями, после эксперимента аккуратно переносили на стекла, покрытые эпоксидным клеем.

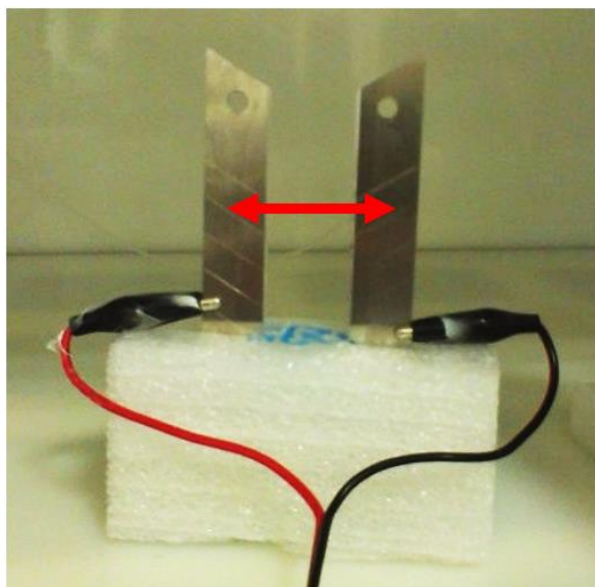


Рисунок 73 – Пара параллельных лезвий с электрическими контактами на них. Красная стрелка показывает преимущественное направление волокон.

#### 5.1.2. Измерение направлений волокон

Для того чтобы описать направления волокон и их укладку, был использован параметр локальной ориентации. Он был предложен в программном модуле OrientationJ [286], который изначально был разработан для описания изгибов на волокнах коллагена, но затем был успешно адаптирован и для электроформованных волокон. Для описания направления волокон в этом модуле используется структурный тензор [286-288], его вычисляют следующим образом. Вначале по известным оттенкам  $I(x, y)$  рассчитывают матрицы частных производных  $I_x(x, y)$  и  $I_y(x, y)$  – это можно сделать с помощью операторов Превитта, как описано выше в разделе 3.4, или другим способом, например,

с помощью В-сплайнов. Затем для каждого пикселя вычисляют четыре компоненты тензора:

$$S = \begin{bmatrix} lx^2 & lx \cdot ly \\ lx \cdot ly & ly^2 \end{bmatrix}$$

Полученную матрицу  $S$  подвергают размытию по Гауссу, затем вычисляют параметр локальной ориентации  $\theta_{\text{лок}}$  как направление большего собственного вектора тензора:

$$\theta_{\text{лок}} = \frac{1}{2} \arctan(2 \frac{S_{12}}{S_{22} - S_{11}})$$

Собственные векторы тензора  $S$  показывают направления максимального и минимального градиента яркости.

Если матрица  $S$  известна для каждой точки изображения  $I(x, y)$ , то можно вычислить для каждой точки  $\theta_{\text{лок}}$  и построить распределение точек по значениям этого параметра. Использование структурного тензора для анализа волокнистых мембран имеет две особенности. Во-первых, параметр локальной ориентации приписывается отдельным пикселям, а не волокнам, и волокна большего диаметра могут давать больший вклад в распределение, чем более тонкие. Во-вторых, программа отбрасывает те пиксели, для которых параметр  $TrS = S_{11} + S_{22}$  лежит на левой границе распределения (менее 2% среди наиболее низких значений). Действительно, если этот параметр мал, то соответствующая точка изображения лежит в относительно однородной области, и приписать ей «направление» не удастся.

### 5.1.3. Обработка мембран спиртом

Для измерения усадки электроформованных мембран в спирте использовали фрагменты размером от 2x2 до 4x4 см<sup>2</sup>. Их погружали в спирт и регистрировали процесс усадки с помощью цифровой камеры C925e. При обработке мембран спиртом в изометрических условиях использовали кольцевые зажимы, аналогичные тем, которые использовались в экспериментах с ПЭВП (раздел 2.1.3).

### 5.1.4. Культивирование клеток на мембранах

Для демонстрации биосовместимости электроформованных мембран, а также для исследования контактного ориентирования использовали клетки двух линий: 3T3 (фибробласты мыши) и HaCaT (кератиноциты человека). Мембраны стерилизовали ультрафиолетом в течение 1 часа (мощность лампы 30 Вт, расстояние от лампы до мембран 20 см). Клетки культивировали в среде DMEM (Панэко, Россия) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, США) и 4 mM L-глутамина. В

некоторых экспериментах добавляли 1% смесь антибиотиков (смесь пенициллина со стрептомицином, Панэко, Россия). Культивирование проходило в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C. Мембраны располагались в ячейках планшетов (4-, 6-, 24- или 48-луночных).

Для улучшения клеточной адгезии на поверхность волокон наносили слой поли-L-лизина или поли-L-орнитина. Для этого мембраны на полчаса погружали в водный раствор соответствующего поликатиона с концентрацией 0.1 мг/мл, а затем отмывали водой.

#### **5.1.5. Визуализация клеток методом КЛСМ**

Для контроля состояния клеток на электроформованных мембранах и измерения формы ядер использовали метод КЛСМ. Клетки окрашивали с помощью красителя ActinRed 555 (Thermo-Fisher Scientific, США), а также Hoechst 33258. Изображения получали с помощью микроскопа Fluoview FV10i (Olympus, Япония).

#### **5.1.6. Визуализация клеток методом СЭМ**

Для исследования клеток, находящихся на электроформованных мембранах, методом СЭМ использовали следующий протокол. Образцы фиксировали в 2,5% растворе глutarового альдегида в фосфатно-солевом буфере. Далее образцы обезвоживали возрастающими концентрациями этанола: по 5 минут в 10%, 30% и 50%, трижды по 10 минут в 70%, по 5 минут в 80% и 90% и трижды по 10 минут в 95% - после чего инкубировали в смеси этанола и HMDS в соотношении 1:1 в течение 10 минут, а затем трижды только в HMDS в течение того же времени. После третьей смены образцы в HMDS оставляли на воздухе до полного испарения реагента.

Образцы, высушенные таким способом, покрывали металлом с помощью установки Sputter Coater Q150T (Quorum Technologies, Великобритания). Изображения получали с помощью микроскопа Merlin (Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 1-3 кВ и электронном токе 70-100 пА.

#### **5.1.7. Механические испытания электроформованных мембран**

Для механических испытаний электроформованных мембран на разрыв из них с помощью лазерного гравера Spirit GLS (GCC, Тайвань) вырезали полоски с размером 30x5 мм<sup>2</sup>. Испытания проводили на установке Autograph AGS-10 kNG (Shimadzu, Япония), рабочая область образца имела размер 20x5 мм<sup>2</sup>, толщина лежала в диапазоне от 100 до 200 мкм. Скорость растяжения составляла 5 мм/мин. Испытания проводили либо на воздухе, либо в 96% этиловом спирте.

### 5.1.8. Рентгеноструктурный анализ

Исследование структуры мембран с помощью рентгеноструктурного анализа проводили на установке XeuSS SAXS/WAXS (Xenocs, France) с источником излучения GeniX3D (длина волны  $\lambda = 1.54\text{\AA}$ ). Использовали детектор Rayonix HS170 CCD (размер пикселя  $132 \times 132 \text{ мкм}^2$ ), расположенный на расстоянии приблизительно 18 см за образцом.

### 5.2. Получение ориентированных субмикронных волокон

При обычном электроспиннинге волокна уложены хаотично, однако для некоторых задач используются мембраны, состоящие из волокон, которые преимущественно выстроены вдоль определенного направления. Такие волокна и мембраны из них называют ориентированными, в англоязычной литературе пишут *aligned mats*. Их могут использовать для направленного роста клеток в некоторых медицинских приложениях (например, для создания искусственных аналогов нервной ткани [289], [290] или мышечной ткани [291], [292], а также в некоторых специализированных технологических задачах, например, в топливных элементах [293].

Наиболее популярные способы получения ориентированных волокон – это метод зазора и метод быстро вращающегося барабана. При использовании первого из этих двух методов, коллектором является пара параллельных лезвий, и волокна выстраиваются в зазоре между ними, с преимущественной ориентацией поперек края лезвия. При использовании второго, коллектором является быстро вращающаяся спица или цилиндр, и волокна выстраиваются преимущественно поперек оси вращения. В большинстве экспериментов, описываемых ниже, был использован метод зазора, т.к. он является одним из широко применяемых «стандартных» подходов.

На рисунке 74 приведены изображения поверхности ориентированной мембраны из ПКЛ и обычной, неориентированной, в которой волокна уложены случайным образом. Эти две мембраны были получены в одинаковых условиях (расстояние до коллектора 30 см, напряжение 30 кВ, скорость подачи раствора 1 мл/ч), но изменялся коллектор – использовали либо металлическую пластину, либо пару лезвий.

Для неориентированной мембраны характерно бимодальное распределение волокон по размерам (рисунок 74 В) – два максимума распределения соответствуют значениям  $300 \pm 100 \text{ нм}$  и  $1,0 \pm 0,2 \text{ мкм}$ . Аналогичное бимодальное распределение наблюдалось при электроспиннинге полиэтиленоксида из водного раствора [294], оно может объясняться расщеплением основной струи на множество более мелких. Для

ориентированных мембран из ПКЛ наблюдалось мономодальное распределение волокон по диаметрам с единственным пиком вблизи среднего значения 600 нм.

Однако в данном эксперименте диаметры волокон менее значимы, чем их взаимное расположение. Графики распределения параметра локальной ориентации представлены на рисунке 74 Г. Для неориентированной мембраны график имеет вид, близкий к горизонтальной линии, что соответствует отсутствию преимущественного направления укладки волокон. Для ориентированной мембраны график имеет вид пика вблизи нуля, т.е. большинство волокон выстроены вдоль одного направления – и именно оно принимается за ось, от которой откладываются углы.

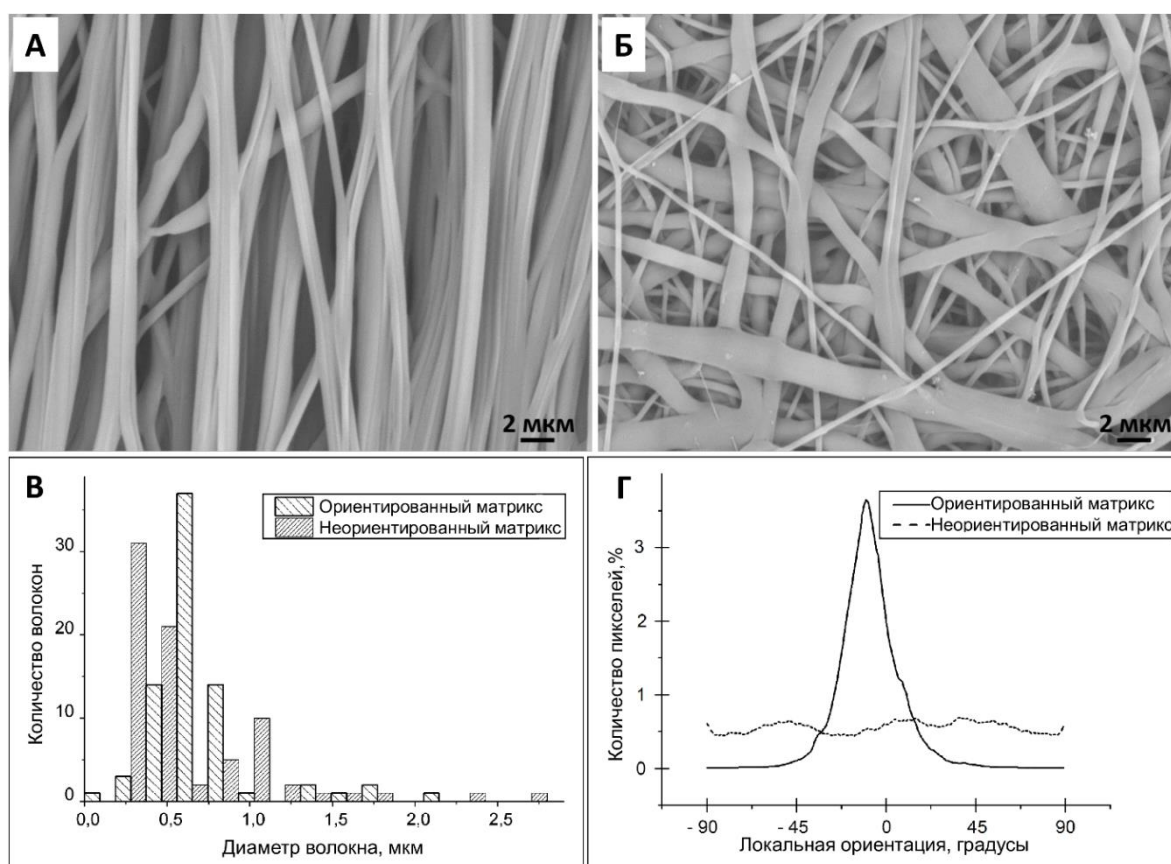


Рисунок 74 – Поверхность ориентированной (А) и неориентированной (Б) мембраны из ПКЛ, В – диаметры волокон, Г – распределения направлений волокон.

Метод зазора, хотя и обеспечивает выравнивание волокон вдоль определенного направления, далеко не всегда удобен в эксплуатации. Во-первых, многие волокна все-таки отклоняются от основного направления. Во-вторых, на макроскопическом уровне зазор между лезвиями, в котором наблюдается интенсивное выравнивание волокон, составляет обычно 1-2 см, и это недостаточно для многих задач. В-третьих, мембраны,

сформированные методом зазора, часто начинают спонтанно изгибаться после снятия их с лезвий.

Нами был предложен метод формирования ориентированных мембран, основанный на их вытяжке в пластификаторе. Оказалось, что этанол обладает пластифицирующим действием на ПЛА, т.е. этанол увеличивает эластичность ПЛА. Если обычную, неориентированную мембрану из ПЛА (рисунок 75 А) растянуть в спирте, то предельное удлинение достигнет  $\varepsilon_{\max}=279 \pm 13\%$ , а волокна выстроятся вдоль одного направления (рисунок 75 Г). Видно, что ориентация выражена значительно сильнее, чем при формировании ориентированной мембраны «методом зазора» (рисунок 75 Б) или путем вытяжки на воздухе (рисунок 75 В, предельное удлинение  $\varepsilon_{\max}=49 \pm 13\%$ ).

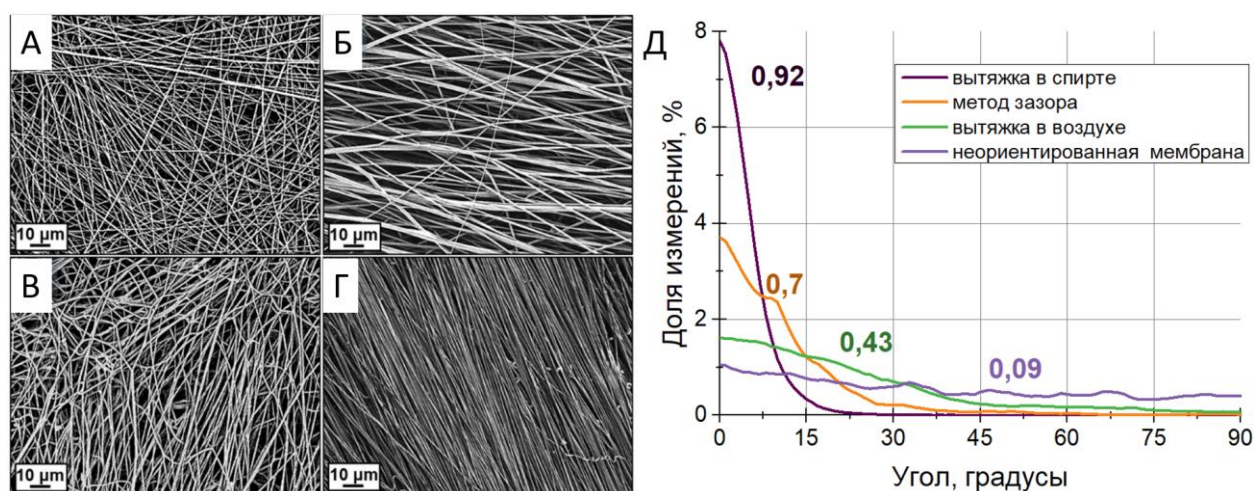


Рисунок 75 – Изготовление ориентированной мембраны из ПЛА путем вытяжки в спирте. А – исходная мембрана, Б – мембрана из ПЛА, сформированная «методом зазора», В – результат вытяжки исходной мембраны на воздухе, Г – результат вытяжки исходной мембраны в спирте, Д – графики параметра локальной ориентации.

Для количественного описания ориентации волокон строили распределения углов между направлением волокон и направлением вытяжки (рисунок 75 Б). В данном случае для каждой пары значений угла  $\theta_{\text{лок}}$ , противоположных по знаку, параметр ориентации усредняли. Наиболее узкое распределение наблюдалось для мембран ПЛА, растянутых в спирте. Эффективность ориентации волокон разными методами описывали с помощью фактора Германа  $f_g = \frac{1}{2}(3 \langle \cos^2 \alpha \rangle - 1)$  [5]. Для неориентированных мембран он составлял 0.09, при вытяжке на воздухе 0.43, при использовании метода зазора 0.7, а при растяжении мембраны в спирте достигал значения 0.92, и это является количественным подтверждением эффективной ориентации волокон.

Укладка волокон, которая сформировалась в результате вытяжки, тесно связана с их механическими свойствами. Для электроформованных мембран из ПЛА были проведены механические испытания на разрыв, причем не только на воздухе, но и в спирте, а также после обработки спиртом различными способами – для свободной мембраны, способной к спонтанной деформации, и в изометрических условиях, когда мембрана зафиксирована в рамке (в обоих случаях после обработки следовала сушка в вакуумном шкафу в течение четырех часов для удаления этанола). Результаты механических испытаний приведены на рисунке 76.

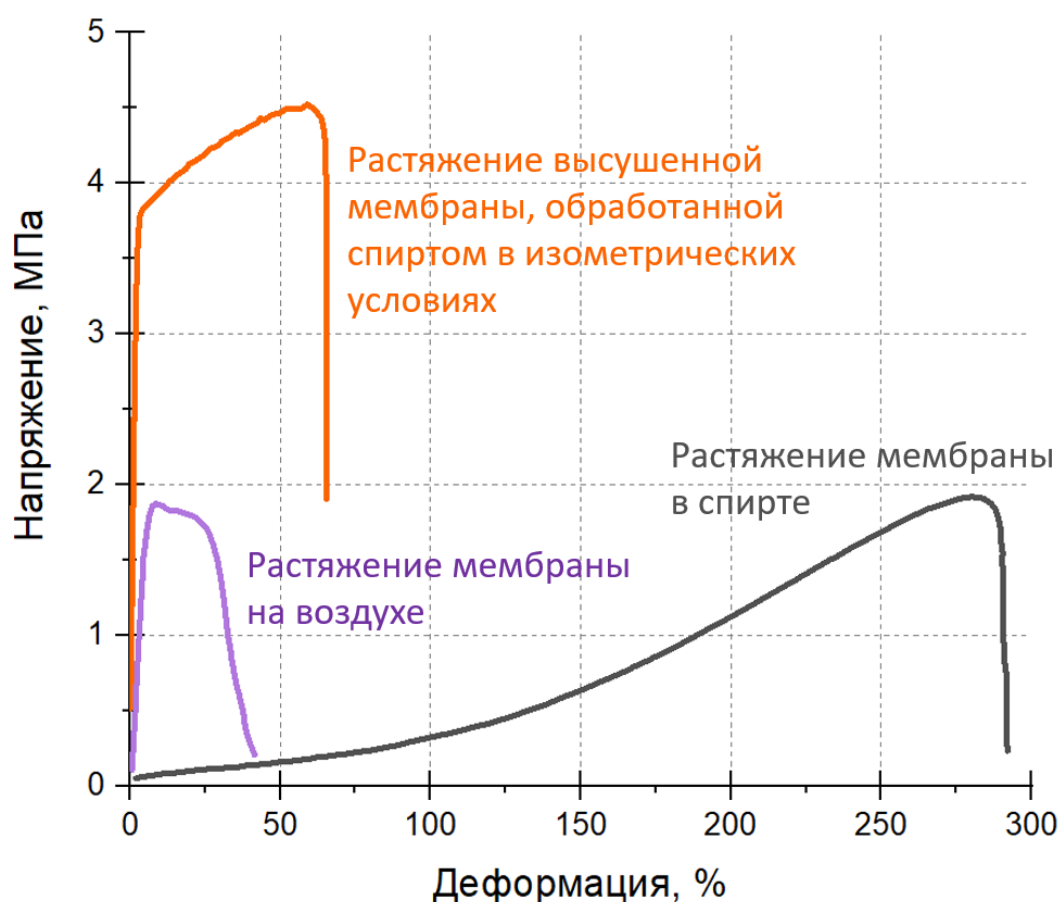


Рисунок 76 – Результаты механических испытаний мембран из ПЛА. Фиолетовая и оранжевая кривая соответствуют растяжению образца на воздухе, серая – в спирте. Оранжевая кривая соответствует растяжению мембраны, обработанной в спирте в изометрических условиях и высушенной.

Если мембрана растягивается на воздухе, то вне зависимости от того, была ли она обработана спиртом, кривая «напряжение-деформация» имеет характерный вид, типичный для полимеров, состоящий из наклонного участка линейной деформации, практически горизонтальной площадки текучести, и последующего спада, связанного с разрывом. При деформации в спирте кривая имеет радикально другой вид – она растет плавно и практически не содержит площадки текучести.

По полученным кривым были вычислены основные механические характеристики (таблица 5). Обработка электроформованной мембраны из ПЛА в спирте делает ее более эластичной, причем этот эффект сохраняется после удаления спирта. По-видимому, именно высокая эластичность позволяет добиться интенсивной ориентации волокон при вытяжке.

Таблица 5 – Механические характеристики мембран из ПЛА, измеренные при разных способах обработки мембраны спиртом

| Тип эксперимента                                                              | Е, МПа        | $\sigma_{пр}$ , МПа | $\epsilon_{max}$ , % |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------|----------------------|
| Растяжение мембраны на воздухе                                                | $88 \pm 22$   | $2,5 \pm 0,9$       | $49 \pm 13$          |
| Растяжение мембраны в спирте                                                  | $0,8 \pm 0,1$ | $1,6 \pm 0,2$       | $279 \pm 13$         |
| Мембрана обработана в спирте в изометрических условиях и растянута на воздухе | $100 \pm 22$  | $4,4 \pm 0,9$       | $110 \pm 42$         |

Итак, этанол оказывает пластифицирующее действие на мембрану из ПЛА. На пленку, приготовленную методом полива, он такого эффекта не оказывает, и это, по-видимому, объясняется тем, что пористая структура мембраны позволяет этанолу значительно лучше проникать в полимер. На качественном уровне механизм пластификации можно объяснить тем, что в присутствии пластификатора полимерные цепи оказываются более подвижны, чем в обычном состоянии [295]. Объяснить изменения, которые происходят с мембраной после обработки этанолом и последующего высушивания, несколько сложнее. Чтобы сделать это хотя бы отчасти, проследим за изменениями структуры мембраны, которые происходят под действием этанола.

Если поместить мембрану из ПЛА в этанол в свободном состоянии, то она сжимается, т.е. претерпевает контракцию, усадку. Из-за этого электроформованные мембраны и другие пористые структуры из ПЛА практически никогда не дезинфицируют спиртом. Контракция мембраны занимает не более 30 секунд и проявляется сокращением площади на 40-50% (рисунок 77 А, каждая кривая соответствует одной мембране).

Макроскопическая усадка, вызванная погружением мембраны в спирт, сопровождалась изменениями микроструктуры (рисунок 77 Б-Г). Волокна изгибались, и из прямых становились извитыми, кроме того, их диаметр возрастал. На рисунке 77

представлена мембрана, для которой средний диаметр волокон увеличился с 570 нм до 600 нм (это изменение значимо по критерию Манна-Уитни). Описанные эффекты отлично соответствуют литературным данным [296].

С молекулярной точки зрения формирование «танцующих волокон» может объясняться следующим образом. В отдельном волокне молекулы полимера обычно уложены так, что их сегменты преимущественно ориентированы вдоль оси волокна [92]. Это состояние является метастабильным – оно сформировалось при быстром удалении растворителя, и поэтому оно далеко от равновесного. Спирт проникает в волокно и увеличивает подвижность молекул, после этого в общем случае могут происходить два процесса. Во-первых, ориентированные фрагменты молекул могут релаксировать, увеличивая при этом свою энтропию. Во-вторых, если полимер способен к кристаллизации, то молекулы могут кристаллизоваться [296].

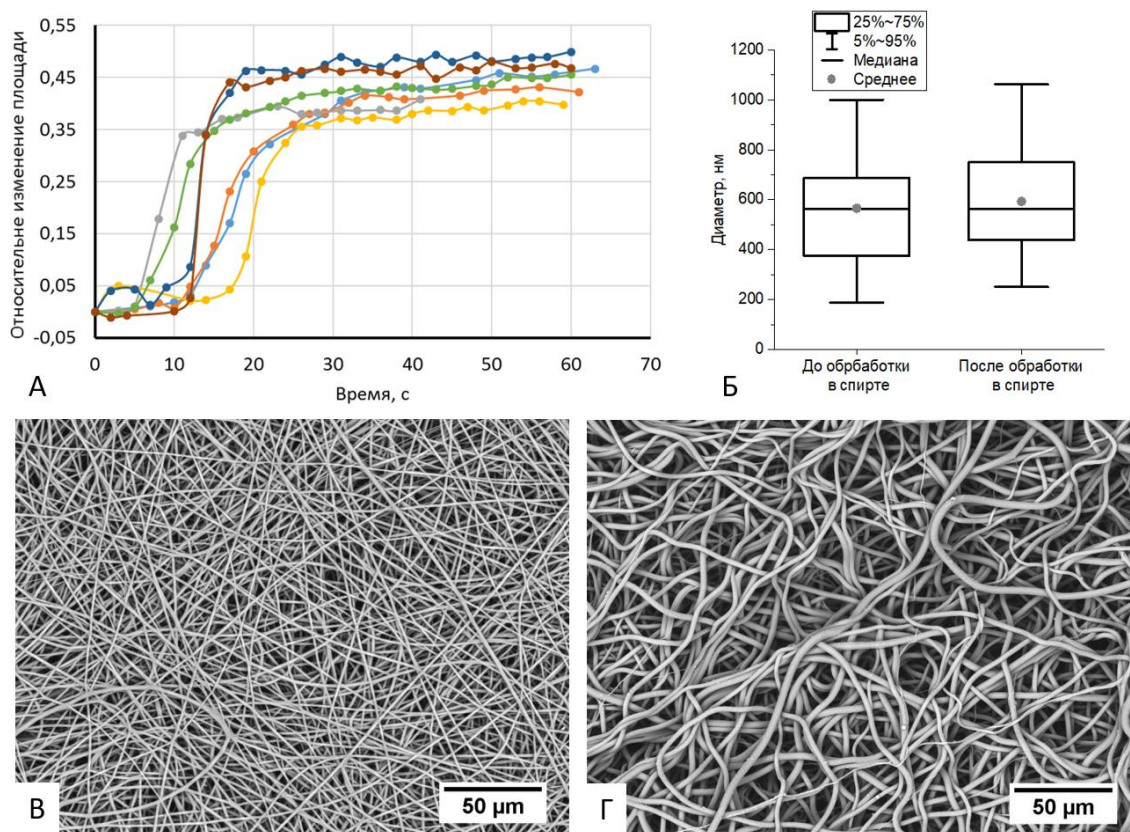


Рисунок 77 – Изменение структуры мембраны из ПЛА под действием этанола. А – зависимость относительного изменения площади мембраны от времени, Б – диаметры волокон мембраны до и после ее обработки спиртом, В, Г – изображения поверхности мембраны до и после обработки спиртом, соответственно.

Выполненные нами эксперименты по дифракции рентгеновских лучей не обнаружили кристалличности на образцах, которые проходили обработку спиртом. Это может объясняться тем, что использованный в этих экспериментах полилактид

содержал 4,5% D-изомера, который нарушал стереорегулярность цепи и препятствовал кристаллизации. Таким образом, из двух предложенных выше объяснений, более вероятным представляется первое, связанное с релаксацией ориентированных фрагментов полимерных цепей.

Коэффициент диффузии этанола в ПЛА был измерен по прохождению паров через пленку ПЛА, и он лежит в диапазоне  $D=1-2 \times 10^{-12} \text{ см}^2/\text{с}$  [297]. В описываемых экспериментах были использованы мембраны, состоящие из волокон со средним диаметром  $d=570 \pm 260 \text{ нм}$ , и характерное время диффузии этанола вглубь такого волокна составляет

$$t \sim \frac{d^2}{4D} \sim \frac{(570 \text{ нм})^2}{4 \cdot 1,5 \cdot 10^{-12} \text{ см}^2/\text{с}} \sim 2 \text{ с}$$

Это значение разумно соответствует тому времени, которое проходило от момента внесения спирта в ячейку до начала усадки мембраны (обычно не более 15 с, рисунок 77 А). Расхождение может быть связано с тем, что использованный в расчетах коэффициент диффузии недооценен. Расхождение также может быть связано с тем, что этанолу требуется некоторое время для того, чтобы смочить все волокна, проникая в пространство между ними.

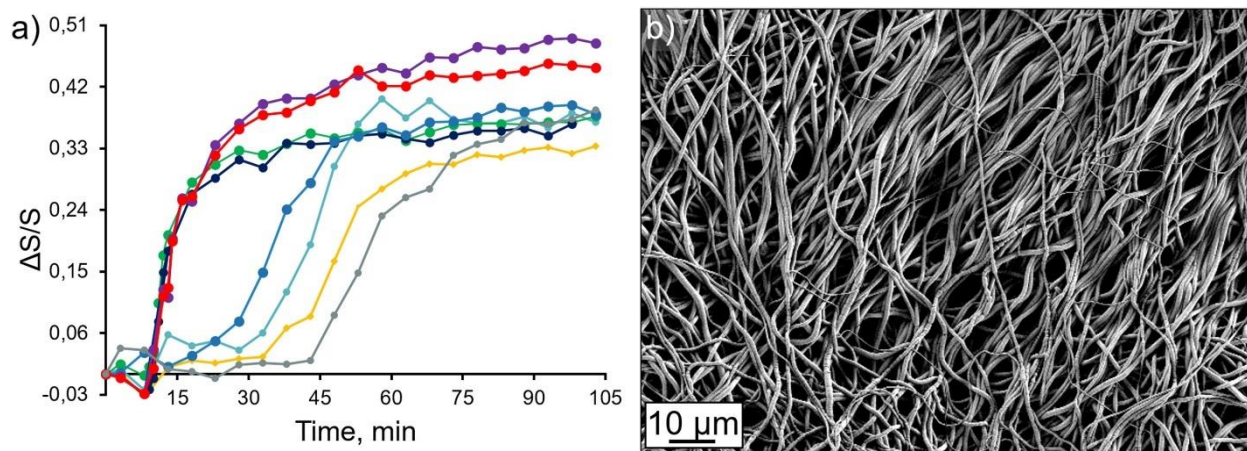


Рисунок 78 – Усадка мембран из ПЛА под действием бутанола. А - зависимость относительного изменения площади мембраны от времени, б – изображение поверхности мембраны после обработки спиртом.

Эффект усадки мембраны и формирования «танцующих волокон» наблюдался не только в этаноле, но и в бутаноле, однако он развивался медленнее – не за 30 секунд, а за 15-45 минут (рисунок 78). При этом величина усадки в бутаноле (33-45%) была близка к усадке в этаноле (40-50%). Вероятно, время усадки связано с диффузией спирта между молекулами ПЛА и для бутанола диффузия происходит медленнее, чем для этанола. Однако величина усадки, по-видимому, определяется прежде всего свойствами самой

мембраны и поэтому сравнительно слабо зависит от природы пластификатора, обеспечивающего повышение подвижности полимерных цепей. На рисунке 78 А видно, что кривые делятся на две группы: в первой группе усадка происходит приблизительно при  $t \sim 15$  мин обработки, а во второй группе – более 30 минут. Такой разброс, по-видимому, обусловлен неоднородностью мембран, а также, возможно, вариациями их толщины.

Итак, были реализованы два способа формирования ориентированных мембран – метод зазора и метод вытяжки в пластификаторе. Если первый является известным и популярным, то второй – сравнительно экзотический; для ПЛА он позволяет резко увеличить степень ориентации волокон и связан с возможностями пластификации мембраны (увеличения ее растяжимости). Пластифицирующее действие спирта на ПЛА показано прямыми механическими измерениями, а также косвенно подтверждено экспериментами по усадке мембран из ПЛА.

### **5.3. Методические особенности, связанные с визуализацией клеток на мембранах**

Подготовка эукариотических клеток для исследования методом СЭМ обычно включает в себя следующие шаги: фиксация, обезвоживание, высушивание, напыление металла. Каждый из этих шагов при неоптимальной реализации может привести к нарушению структуры образца и стать причиной артефактов на изображениях (образованию пор в мембранах, деформации клеток и другим) [227], [298-300]. Для обеспечения сохранности клеточных мембран их часто обрабатывают тетраоксидом осмия. Он стабилизирует их и предотвращает их повреждения в ходе дегидратации, но сам по себе является опасным веществом, и по возможности от его использования желательно воздержаться. Задача подготовки клеток к исследованию дополнительно усложняется, если клетки выращены на электроформованных полимерных волокнах, т.к. волокна могут набухать или растворяться в тех средах, которые используются при пробоподготовке.

Существует несколько методов высушивания биологических образцов для сканирующей электронной микроскопии, наиболее популярным из которых является сушка в критической точке (critical point drying, CPD). Его основная идея заключается в исчезновении фазовой границы между жидкостью и газом при определенных температуре и давлении, в результате чего исчезает поверхностное натяжение, и, как следствие, образец не повреждается в процессе сушки. В то же время существует более быстрый альтернативный метод, не требующий специализированного оборудования –

химическая сушка с использованием гексаметилдисилазана (HMDS). Он обладает сравнительно низким поверхностным натяжением (при 293К вода – 72,8 мН/м; ацетон – 23,7 мН/м; этанол – 22,3 мН/м; HMDS – 18,2 мН/м). Кроме того, некоторые авторы предполагают, что он может сшивать белки мембраны, делая ее более прочной и помогая сохранить форму при высыхании [301].

Обезвоживание образцов обычно выполняют путем их инкубации в водно-спиртовых смесях с увеличивающейся концентрацией спирта, а затем образцы переводят в ацетон. Использование ацетона объясняется тем, что на практике легко найти безводный ацетон, а подготовка безводного этанола требует специфической работы. Многие полиэфиры, использованные в работе (например, ПЛА), набухают или растворяются в ацетоне, и поэтому контакт образцов с ацетоном не приемлем. Отказаться от использования ацетона при физической сушке (CPD) сравнительно сложно, а при химической легко – эмпирически установлено, что сушка с помощью HMDS менее чувствительна к следам воды, присутствующим в образце, чем CPD.

Для демонстрации этой особенности были использованы образцы клеток NaCaT, выращенные на электроформованных мембранах из нейлона-6 (рисунок 79). У клеток, подготовленных с помощью HMDS, мембраны выглядят практически целыми, а у клеток, которые были подготовлены с помощью CPD, они выглядят поврежденными, и скорее всего, это связано с влиянием ацетона. В некоторых работах указано, что эти две процедуры дают сходные результаты [302], [303], однако некоторые авторы отдают предпочтение химической сушке с HMDS [304]. Ее несомненным преимуществом является отсутствие необходимости в использовании специализированного оборудования.

Для количественного описания разницы между образцами клеток, подготовленными каждым из двух обсуждаемых способов, вычисляли долю поверхности, занятую микроворсинками, и их размеры. Оказалось, что доля составляла  $35 \pm 13\%$  и  $17 \pm 8\%$  для HMDS и CPD соответственно, а ширина микроворсинок составляла  $160 \pm 20$  нм и  $110 \pm 10$  нм. Последние числа наверняка завышены, т.к. образец покрывали слоем металла перед исследованием. Существование микроворсинок на поверхности клеток NaCaT было подтверждено прижизненным методом визуализации – ион-проводящей микроскопией [305].

В заключение данного подраздела прокомментируем особенность съемки. Один из микроскопов, использованных в данной работе, оснащен двумя детекторами:

детектором вторичных электронов Эверхарта-Торнли (HE-SE2) и внутрилинзовым детектором. Они давали сходные изображения (рисунок 80), но при использовании детектора HE-SE2 возле объектов появлялись явные тени, т.к. детектор расположен сбоку от образца. Общее сходство изображений, получаемых этими двумя детекторами, согласуется с указанным выше результатом, полученным при исследовании волокон методом корреляционной микроскопии (рисунок 47 А, Б выше). В связи со сходством этих изображений, далее в тексте не указан тип использованного детектора.

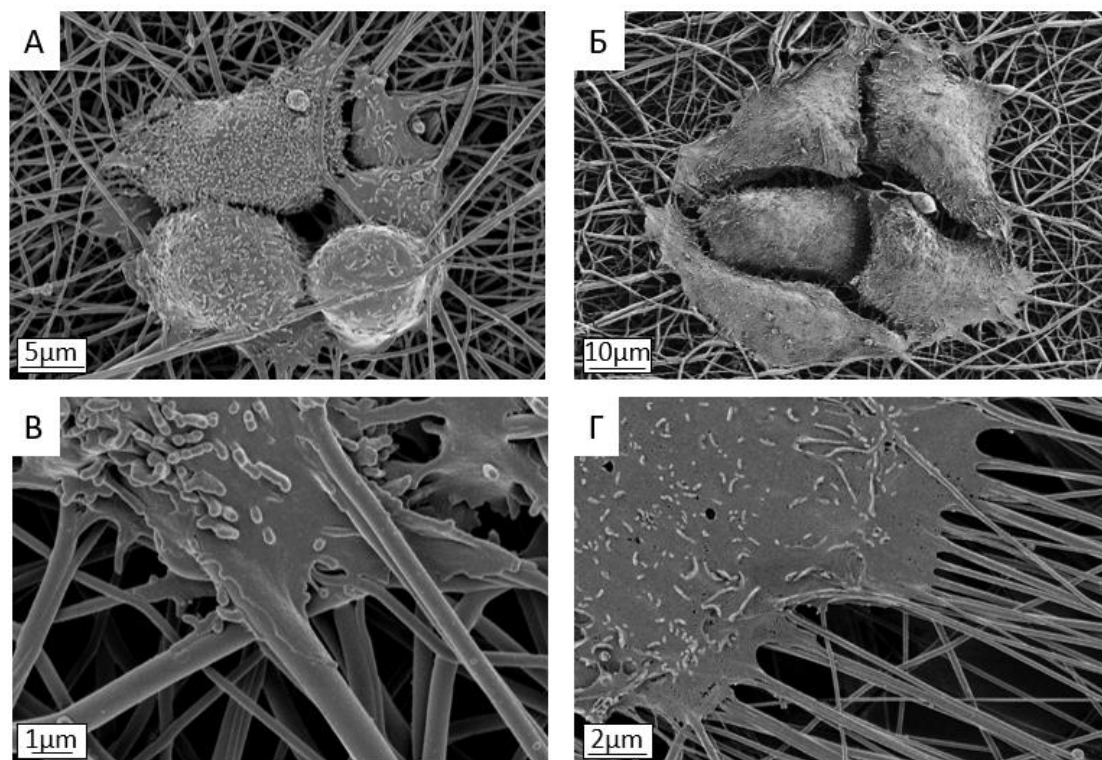


Рисунок 79 – Изображения кератиноцитов HaCaT, выращенных на электроформованных мембранах из нейлона-6. А, В – образец подготовлен с помощью сушки с использованием HMDS, Б, Г – образец подготовлен с помощью сушки с использованием CPD.

Отличительной особенностью протокола, использованного в данной работе для подготовки клеток, также является большое количество шагов, которое использовано при дегидратации: их было двенадцать, по рекомендации из работ [227], [304], хотя многие авторы используют пять-шесть шагов [306-308]. Считается, что многоступенчатая плавная дегидратация обеспечивает лучшую сохранность клеток, чем резкая, при которой концентрация воды снижается быстро.

Описанный в данном подразделе протокол подготовки образцов к исследованию методом СЭМ был использован для установления закономерностей контактного ориентирования клеток на электроформованных мембранах.

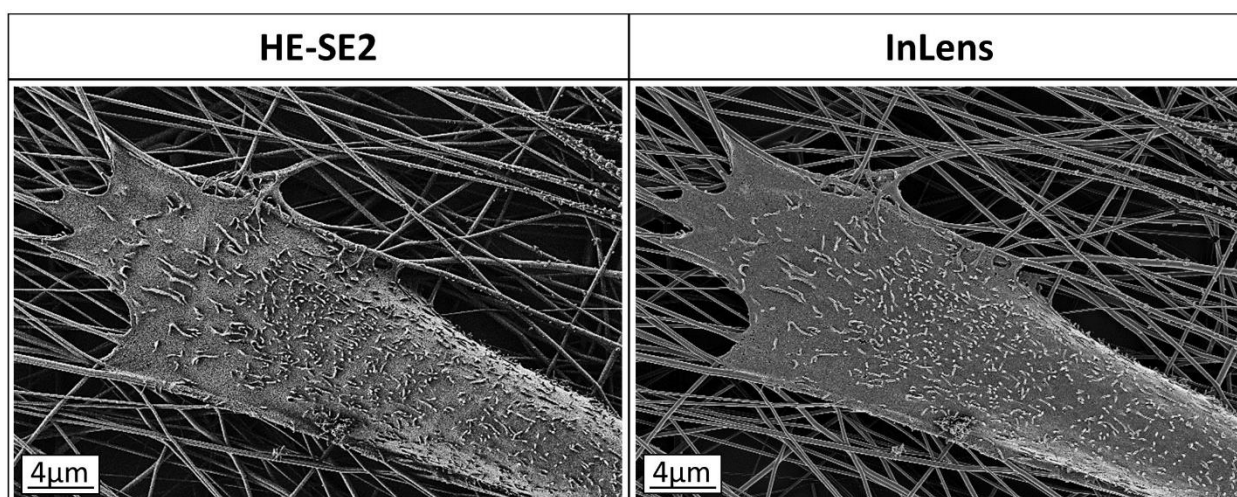


Рисунок 80 – Изображения кератиноцита на волокнах нейлона, полученные с помощью детектора HE-SE2 (слева) и внутрилинзового детектора (справа).

#### 5.4. Контактное ориентирование клеток на поверхности электроформованных мембран

Мембраны из ориентированных волокон, описанию которых посвящен данный раздел, могут использоваться в тканевой инженерии – для моделирования тех тканей, внеклеточный матрикс которых состоит из ориентированных волокон (например, сухожилия и скелетные мышцы [309]). Сравним форму клеток, находящихся на поверхности ориентированных мембран и обычных, т.е. состоящих из хаотично уложенных волокон. Методом СЭМ было показано, что укладка волокон ПКЛ, формирующих субстрат (подложку), влияет на форму кератиноцитов HaCaT (Рисунок 81 А, Б). Количественной характеристикой этого влияния является отношение размеров клетки (aspect ratio, AR). Для вычисления этого параметра отдельно лежащие клетки измеряют вдоль двух взаимно перпендикулярных направлений, а затем вычисляют отношение большего размера к меньшему. На рисунке 81 В представлено сравнение средних значений AR клеток, выращенных на ориентированных и неориентированных мембранах из ПКЛ (ориентированные мембраны для этого эксперимента были изготовлены методом зазора). Полученные значения составили  $4.2 \pm 2.8$  и  $1.5 \pm 0.3$  (среднее  $\pm$  стандартное отклонение) для ориентированных и неориентированных матриксов соответственно, что говорит о существенных различиях в форме клеток. По критерию Манна-Уитни указанная разница значима ( $p < 0.05$ ). Ориентированные волокна ПКЛ для этого эксперимента были получены традиционным «методом зазора».

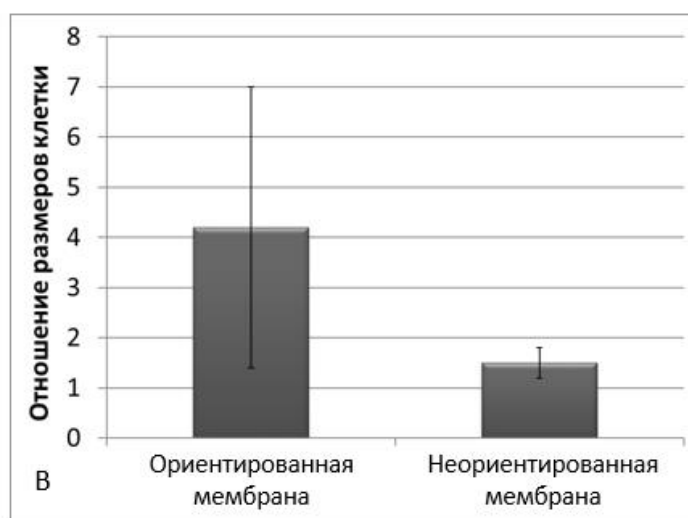
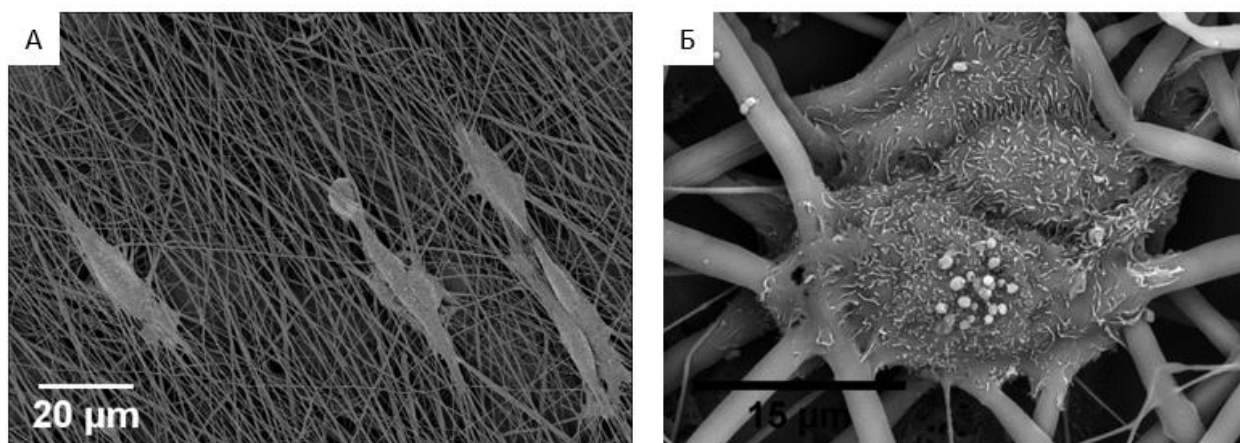


Рисунок 81 – Контактное ориентирование клеток HaCaT на электроформованных мембранах из ПКЛ. СЭМ-изображения клеток на мембранах из ориентированных (А) и случайно уложенных волокон (Б). Соотношение размеров клеток HaCaT, выращенных на мембранах с разной укладкой волокон (В).

Аналогично, клетки HaCaT вытягивались вдоль волокон ПЛА в мембранах, деформированных в спирте. Это проиллюстрировано на рисунке 82. Особенность этого эксперимента состояла в том, что вытяжке в спирте подвергали мембраны, приготовленные из растворов ПЛА в ГФИП с разными концентрациями (4.5% и 7%), а также с использованием разных значений ускоряющего напряжения (30 кВ и 20 кВ соответственно). Это позволило получить ориентированные мембраны, в которых средние диаметры волокон различались в 3.6 раз и составляли  $0.5 \pm 0.2$  мкм и  $1.8 \pm 0.8$  мкм. И те, и другие волокна вызвали изменение формы клеток (рисунок 82 В). Разница между этими двумя мембранами состояла в том, что на мембране из сравнительно тонких волокон ( $0.5 \pm 0.2$  мкм) каждая клетка обычно контактировала с множеством волокон ( $N > 10$ ). В то же время, на мембране из волокон большего диаметра количество контактов было меньше ( $N = 2-4$ ), некоторые клетки проникали в поры между ними,

например, на рисунке 82 В клетка находится под волокном. Аналогично, фибробласты 3Т3 при культивировании на ориентированных мембранах принимали вытянутую форму и вытягивались вдоль волокон.

Данные о кератиноцитах HaCaT, полученные в данной работе, а также обширные литературные данные о контактном ориентировании, говорят, что материал волокон сравнительно слабо влияет на форму клеток; важнее принципиальная способность клеток прикрепляться к нему и тип клеток (их происхождение и биологические особенности) [310], [311].

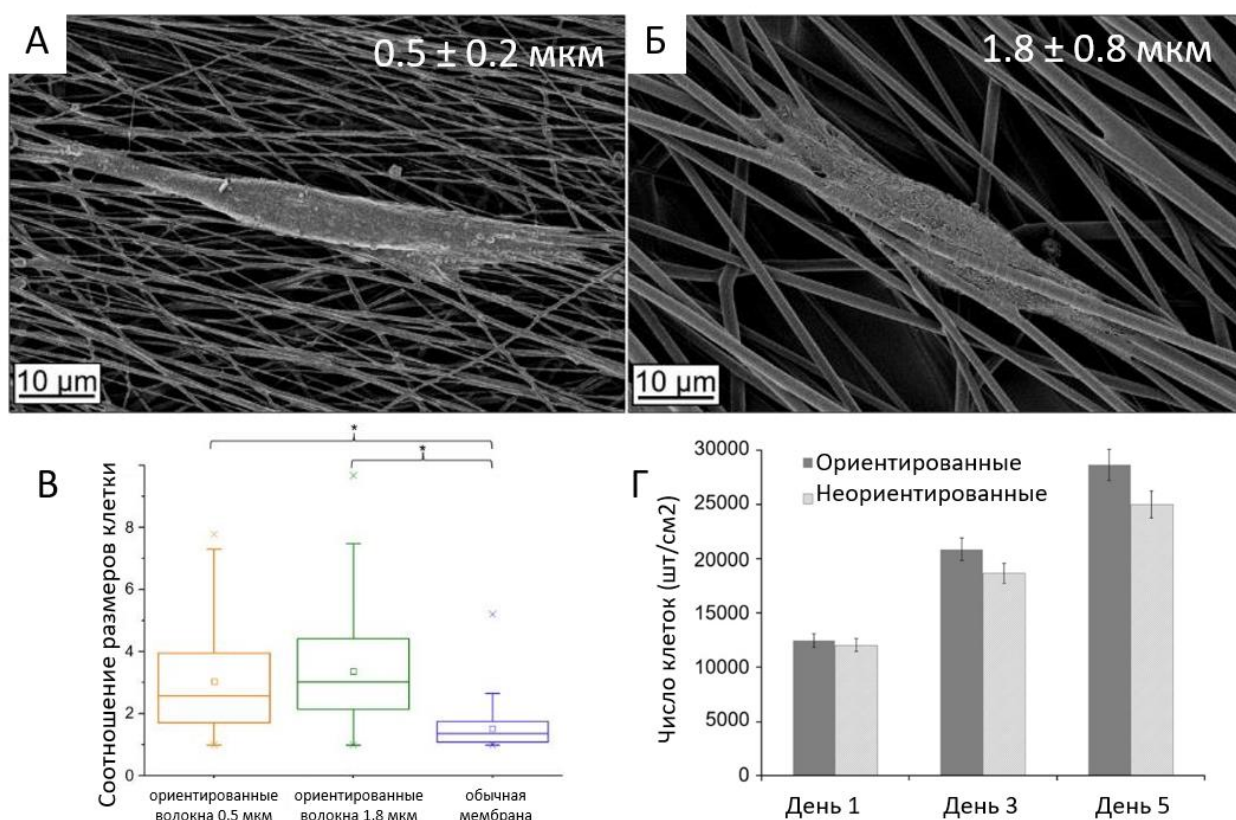


Рисунок 82 – Контактное ориентирование клеток HaCaT на электроформованных мембранах из ПЛА, ориентированных с помощью вытяжки в спирте. А – клетка на волокнах с диаметром  $0.5 \pm 0.2 \text{ мкм}$ , Б – клетка на волокнах с диаметром  $1.8 \pm 0.8 \text{ мкм}$ , В – сравнение соотношений размеров клеток, Г – сравнение пролиферации клеток.

На ориентированных мембранах количество клеток было обычно больше, чем на неориентированных (рисунок 82 Г). Это соответствует результатам, описанным в работе об исследовании клеток пупочной вены человека HUVEC на волокнах из поли(глицерол себаката) и ПКЛ [312]. Эта закономерность может объясняться тем, что хаотично уложенные волокна не всегда обеспечивают клеткам достаточную площадь для прикрепления [313]. В то же время положительное влияние ориентированного субстрата на адгезию и пролиферацию клеток нельзя считать универсальным явлением. Для

некоторых типов клеток и материалов субстратов оно не наблюдается [311] или вовсе наблюдается снижение пролиферации на ориентированных субстратах, по сравнению с неориентированными [314]. В общем случае зависимость пролиферации от рельефа субстрата носит сложный многофакторный характер и является предметом активного изучения [315].

Рельеф субстрата влияет не только на форму клетки в целом, но и на форму ее ядра. Для демонстрации этой особенности был использован метод КЛСМ (рисунок 83). Изображения актинового цитоскелета показывают, что в клетках, выращенных на ориентированной мембране, его волокна преимущественно выстроены вдоль одного направления, которое совпадает с направлением волокон мембраны (рисунок 83 А). В то же время, для клеток, выращенных на неориентированной мембране, такое выделенное направление отсутствует (рисунок 83 Б). При этом ядра клеток также преимущественно вытягиваются вдоль выделенного направления (рисунок 83 В, Г).

Для количественного описания этого явления для каждой клетки выбирали оптический срез, на котором ядро имело наибольшую площадь и чёткие границы. С помощью программы Fiji изображение ядра аппроксимировали эллипсом и вычисляли соотношение большой и малой осей эллипса (“отношение размеров ядра”). Эти отношения были вычислены для 230 клеточных ядер, выращенных на ориентированных мембранах, и для такого же количества – на неориентированных. Гистограммы соответствующих распределений представлены на рисунке 83 Д. Клеточные ядра обычно не являются строго круглыми, поэтому для клеток, выращенных на неориентированной мембране, максимум распределения соответствует значению 1.4. Для клеток, выращенных на ориентированной мембране, распределение было шире и сдвинуто вправо, максимум приходился на 1.5, кроме того, у распределения был дополнительный пик вблизи 1.8. По критерию Манна-Уитни эти распределения достоверно различались ( $p < 0.0001$ ), т.е. ядра клеток, выращенных на ориентированных мембранах, были деформированы. Этот результат может иметь значение для объяснения физиологических изменений в состоянии клеток, находящихся на ориентированных субстратах.

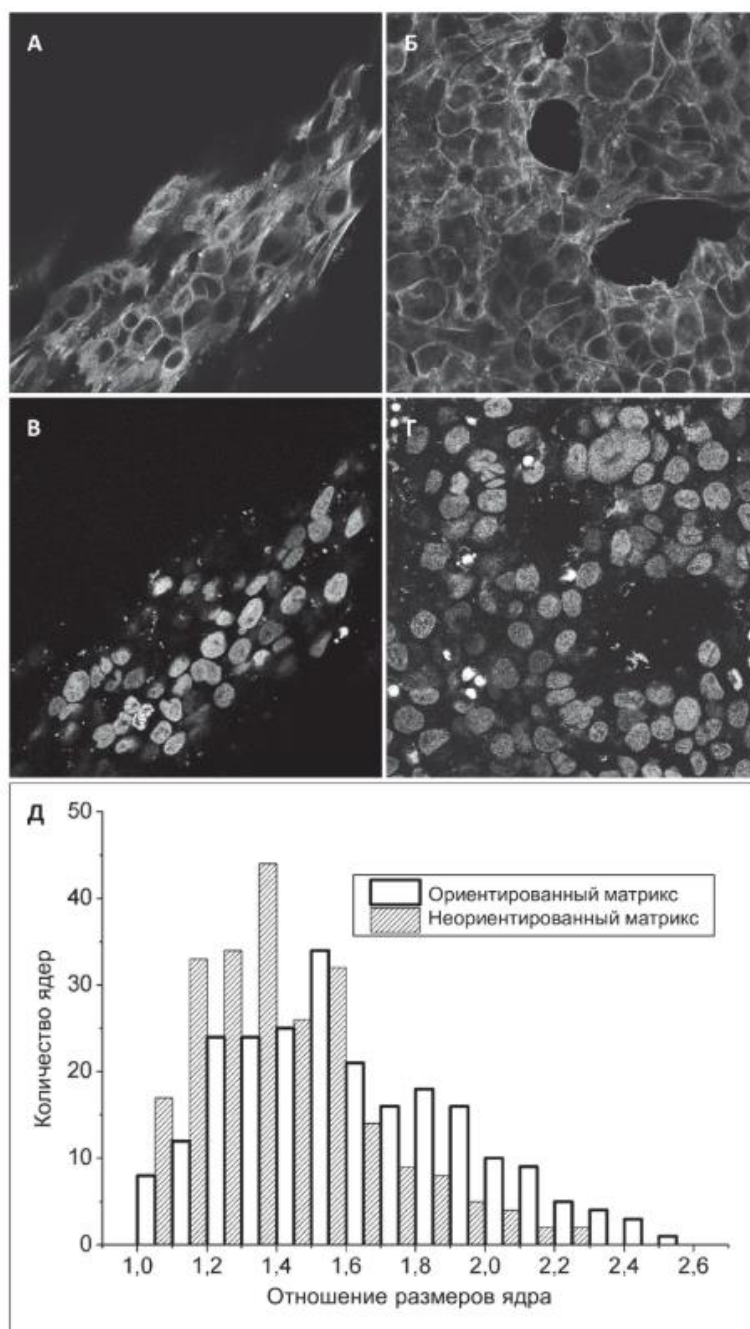


Рисунок 83 – Клетки NaCaT, выращенные на мембранах из ПКЛ. А и Б - изображения цитоскелета (краситель ActinRed 555) на ориентированных и неориентированных мембранах соответственно; В и Г – изображения ядер (краситель Hoechst 33258), на этих же участках; Д – распределения соотношений размеров ядер.

Качественные модели, объясняющие это явление, были предложены для описания клеток на субстратах с микровыступами [316-318]. Согласно первой модели, при распластывании клетки по субстрату волокна цитоскелета натягиваются, при этом те из них, которые проходят над ядром, начинают толкать его в сторону субстрата и вызывают деформацию ядра. Согласно второй модели, сила, прижимающая ядро к субстрату, возникает за счет актиновых волокон, которые тянутся одним концом к мембране, а

другим – к ядру. Согласно третьей модели, форма ядра регулируется актиновым “конвертом”, расположенным вокруг ядра. Изменения формы ядра, вызванные рельефом субстрата, могут влиять на доступность определенных участков ядра для ферментов, регулирующих транскрипцию, и тем самым влиять на уровни экспрессии генов [319], [320].

В заключение этого раздела подчеркнем, что многие мембраны, описанные в данной работе, показали свою биосовместимость в экспериментах на клетках, а некоторые – и в экспериментах на животных. Для иллюстрации биосовместимости, в дополнение к уже показанным изображениям клеток, можно привести результаты прямого подсчета их количества на ориентированных и хаотично уложенных волокнах ПЛА (рисунок 82 Г).

В целом, в данной главе показано, что растяжение электроформованной мембраны из полилактида в спирте позволяет получить ориентированные волокна (фактор ориентации  $f_g=0.92$ ), причем более эффективно, чем при использовании традиционного «метода зазора» (фактор ориентации  $f_g=0.7$ ). При культивировании клеток на полимерных волокнах, выстроенных вдоль одного направления, наблюдается контактное ориентирование.

## **6. Использование электроформованных мембран в биосенсорах**

*В этой главе использован материал статей [A29]-[A33]. Личный вклад автора состоял в планировании и разработке концепции экспериментов, руководстве работами и обработке данных, проведении расчетов с помощью модели диффузии-адвекции.*

### **6.1. Материалы и методы**

#### **6.1.1. Электроформованные мембраны**

В этой части работы использовали мембраны из полидиоксанона (их готовили как описано в разделе 2.1.7) и из нитроцеллюлозы (при их приготовлении использовали смесь ацетона и ДМФА в соотношении 7:3 или 8:2 по объему, как описано в разделе 2.5). Использовали именно эти мембраны, потому что они гидрофильны и впитывают водные растворы. Для исследования их структуры использовали СЭМ, а для оценки пористости – КЛСМ. Для исследования методом КЛСМ мембраны обрабатывали антивидовыми антителами, конъюгированными с флуоресцеином, а затем отмывали и заключали в заливочную среду на основе поливинилового спирта Mowiol 4-88. Измерения проводили на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation, Япония). Съемку проводили через покровное стекло, расположенное поверх волокон. Использовали объектив Aro TIRF Plan Fluor 63×/1.49.

#### **6.1.2. Пропускание растворов через мембрану из ПДО**

Мембранный биосенсор предполагает систему, в которой исследуемый раствор взаимодействует с мембраной, и происходит адсорбция аналита на поверхность полимера, из которого состоит мембрана (или связывание аналита с рецепторным слоем, сформированным на этой поверхности). Растворы можно наносить на мембрану разными способами: либо путем инкубации мембраны в растворе, либо путем пропускания раствора через мембрану под давлением. Для этого нами была сделана система, в которой мембрана зафиксирована в зажиме, а поток жидкости поступает перпендикулярно её лицевой стороне. Структура зажима ограничивает область мембраны диаметром 6 мм, и имеет специальные поддерживающие элементы, которые не позволяют мембране прогибаться под действием потока жидкости. Зажим был изготовлен из листа поликарбоната с помощью фрезеровки и сверления. Для подключения шлангов, по которым подавали растворы, в отверстиях на зажиме закреплены металлические трубки с внешним диаметром 0.8 мм. Поддерживающие элементы и элементы, ограничивающие рабочую область мембраны, изготовлены из листов полиэтилентерефталата толщиной 0.2 мм с помощью лазерной абляции на станке

GLS Spirit. Эти элементы приклеены к поверхности поликарбоната с помощью листового акрилового адгезива 3М 468MP. «Мертвый» объем такой системы составил приблизительно  $\sim 100$  мкл. На рисунке 84А представлена схема зажима, стрелками указано направление потока жидкости. Для фиксации зажима используется внешняя оправка из металлических деталей, скрепляемых винтами. Были изготовлены зажимы для одновременной обработки четырех или шести мембран (рисунок 84 Б). Для создания потока жидкости через них использовали перистальтический насос Chongy BT100M DG-8 и силиконовые шланги TYGON S3 с внутренним диаметром 0,51 мм.

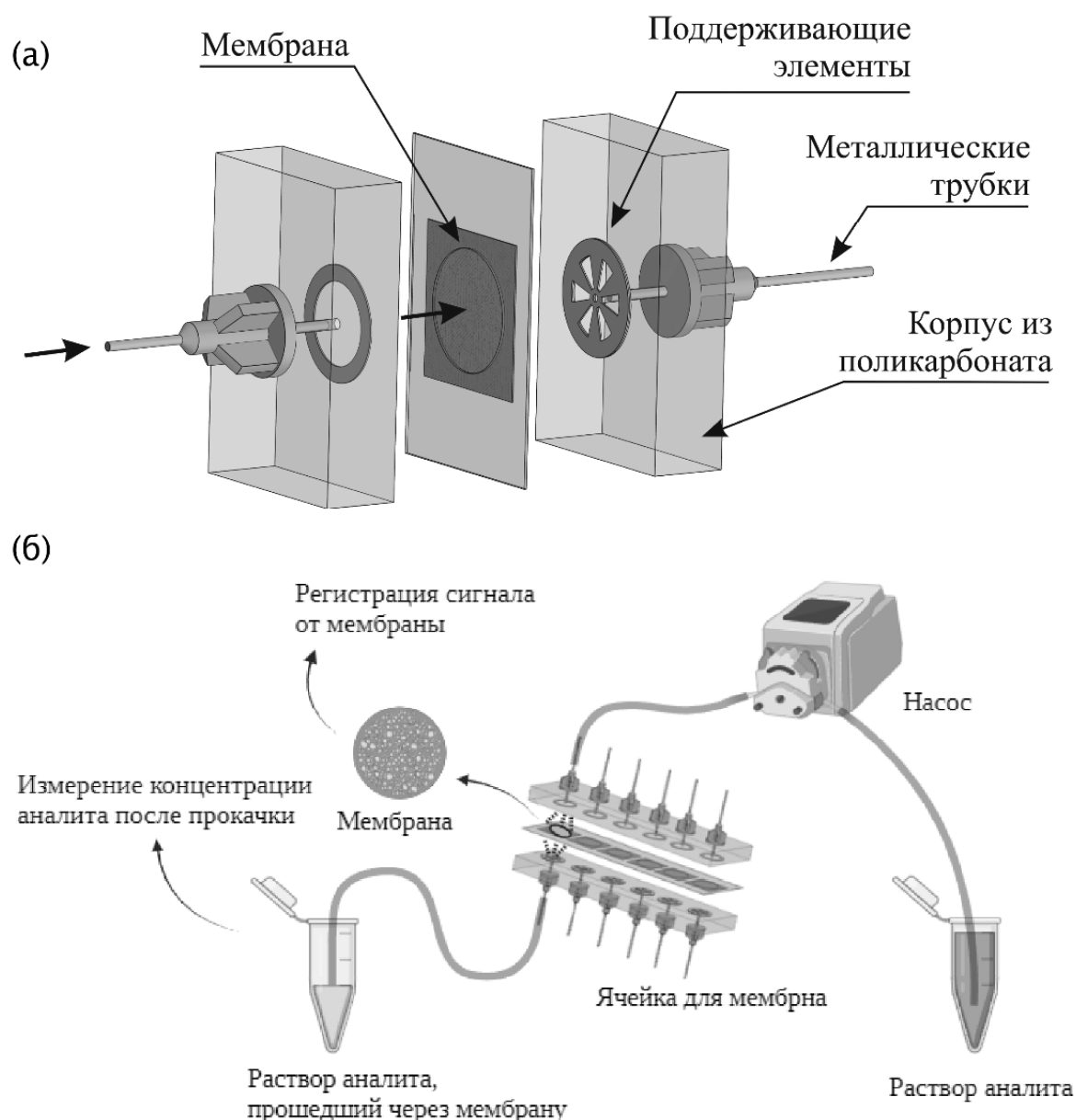


Рисунок 84 – Схема зажима для мембран (а) и общая схема эксперимента по адсорбции аналитов на мембрану из потока жидкости (б).

Перед экспериментами внутренние поверхности зажима и шлангов блокировали путем пропускания 1% раствора БСА, а затем промывали PBS, и только после этого мембрану размещали в зажиме. После каждого эксперимента систему промывали 70% этанолом, дистиллированной водой и высушивали потоком воздуха.

Как показано на рисунке 84 Б, информация об адсорбции аналита на мембрану может быть получена путем измерения оптического сигнала от мембраны, либо путем измерения концентрации аналита в растворе, прошедшем через мембрану. Пропускание раствора аналита через мембрану могло быть либо однократным, либо циклическим.

### 6.1.3. Измерение неспецифической адсорбции БСА на мембрану из ПДО

Для анализа неспецифической адсорбции белка на электроформованные волокна использовали бычий сывороточный альбумин, меченный флуорофором Cy3 (БСА-Cy3) (рисунок 85 А). Перед экспериментом все поверхности, которые в ходе эксперимента контактировали с рабочими растворами (внутренние поверхности пробирок и шлангов), были заблокированы 1.5% раствором немеченого БСА в PBS и затем отмыты PBST, чтобы минимизировать неспецифическое связывание аналита с этими поверхностями.

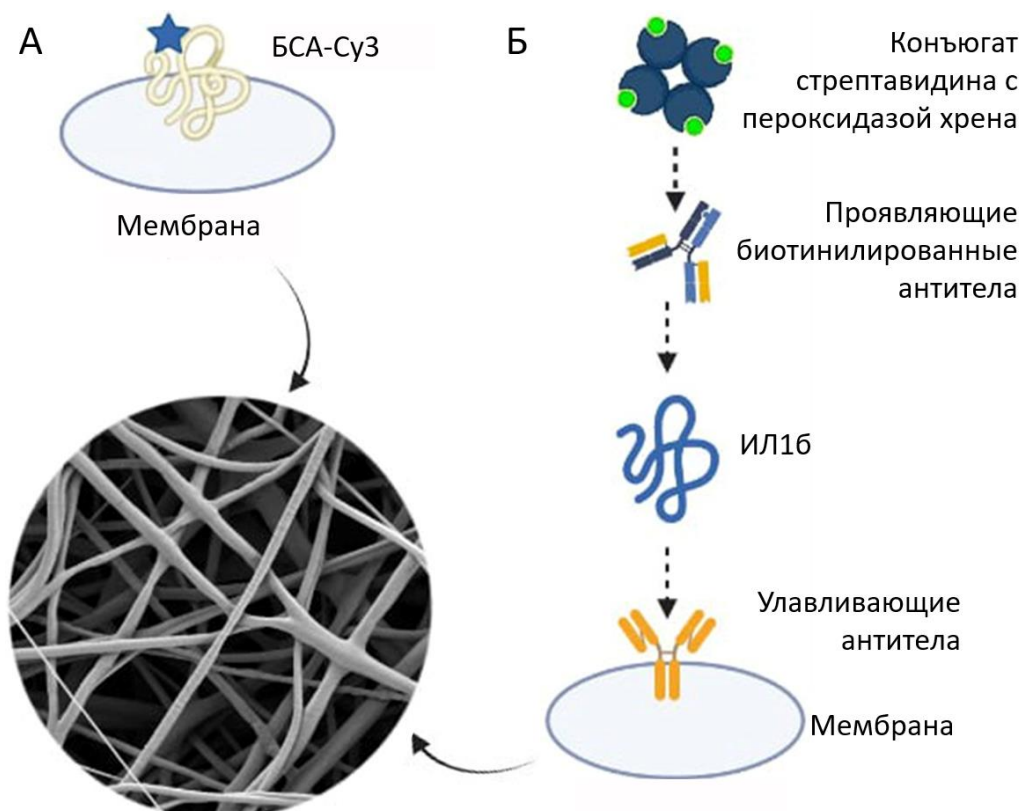


Рисунок 85 – Схемы адсорбции аналитов на мембрану. А – неспецифическая адсорбция БСА, меченого Cy3. Б – специфическая адсорбция ИЛ16 на мембрану, модифицированную антителами, и его последующая проявка с помощью конъюгатов стрептавидина с пероксидазой хрена.

В эксперименте использовали растворы БСА-СуЗ с концентрацией 125, 250, 500 и 1000 нг/мл в PBS. Их наносили на мембрану либо путем циклического пропускания раствора через мембрану, либо путем инкубации мембраны в растворе, причем в обоих случаях система была закрыта от света, чтобы не допустить выгорания флуоресцентного красителя. Флуоресценцию мембран измеряли на планшетном ридере CLARIOstar (фильтр возбуждения 530/20 нм и фильтр эмиссии 580/30 нм). Для этого мембраны извлекали из зажима, ножом для панч-биопсии вырезали из них фрагменты с диаметром 6 мм, и располагали эти фрагменты в 96-луночной планшете.

С помощью этого же ридера CLARIOstar (или с помощью аналогичного ридера Hidex Chameleon) измеряли концентрации БСА-СуЗ в растворах, которые контактировали с мембранами. Для этого использовали калибровочную зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации раствора. Для ее построения готовили растворы с концентрациями в диапазоне 62,5-1000 нг/мл с двукратным шагом по концентрации.

#### **6.1.4. Измерение специфического связывания**

Для исследования особенностей специфического связывания белка с антителами, иммобилизованными на электроформованных волокнах, в качестве анализита использовали интерлейкин-1 $\beta$  (ИЛ1 $\beta$ ). Были использованы реагенты из набора для определения ИЛ1 $\beta$  методом ИФА PSA563Hu01 (Cloud-Clone Corp, Китай). Был выбран именно этот набор, т.к. в него входят и улавливающие, и проявляющие антитела в виде растворов, а в большинстве аналогичных наборов улавливающие антитела иммобилизованы на пластике, и их невозможно перенести на волокна.

Перед экспериментом все поверхности, которые в ходе эксперимента контактировали с растворами ИЛ1 $\beta$  (внутренние поверхности пробирок и шлангов), были заблокированы 1.5% раствором БСА в PBS и затем отмыты PBST, чтобы минимизировать неспецифическое связывание анализита с этими поверхностями. Затем на мембраны были нанесены улавливающие антитела против ИЛ1 $\beta$  (анти-ИЛ1 $\beta$ , 4 мкг/мл в PBS), а свободная поверхность мембран была заблокирована БСА, после этого мембраны были отмыты PBST и PBS. Эти процедуры были выполнены с помощью проточной системы, чтобы максимизировать адсорбцию антител на волокна.

Растворы ИЛ1 $\beta$  были приготовлены в блокировочном буфере (4% эмбриональной бычьей сыворотки, 0.1% БСА, PBST). Использовали специальную сыворотку, очищенную фильтрацией, чтобы исключить неконтролируемую примесь ИЛ1 $\beta$  в

блокировочном буфере. Концентрация стокового раствора ИЛ16 составляла 1000 пг/мл, рабочие растворы имели концентрации в диапазоне 0-400 пг/мл. При пропускании растворов через мембраны их концентрации немного снижались (они составляли приблизительно 91, 182 и 364 пг/мл вместо 100, 200 и 400 пг/мл соответственно), т.к. перед экспериментом шланги проточной системы были заполнены блокировочным буфером, и растворы разбавлялись в ~1,1 раз при заполнении системы. Мембраны либо инкубировали в растворах ИЛ16 при небольшом покачивании (200 rpm), либо эти растворы пропускали через мембраны в течение 1 часа. Количество ИЛ16, оставшееся в растворе после контакта с мембраной, измеряли с помощью набора PSA563Hu01 в соответствии с процедурой, рекомендованной производителем.

Для измерения оптических сигналов от мембран использовали следующие процедуры. Мембраны промывали (три раза по 500 мкл PBST, по 5 минут), а затем на них наносили биотинилированные проявляющие антитела (350 мкл раствора с концентрацией 500 нг/мл). Их наносили либо циклической прокачкой, либо инкубацией – как и пробу ИЛ16. После этого мембраны снова отмывали и наносили либо конъюгаты стрептавидина с красителем Alexa Fluor 594, либо конъюгаты стрептавидина с пероксидазой хрена, для последующей флуоресцентной или хемилюминесцентной детекции соответственно.

При использовании флуоресцентной детекции, флуоресценцию мембран измеряли с помощью планшетного ридера CLARIOstar (фильтр возбуждения 575/20 нм, фильтр эмиссии 630/40 нм). При использовании хемилюминесцентной детекции на мембраны, обработанные конъюгатами стрептавидина с пероксидазой хрена, наносили хемилюминесцентный субстрат Clarity Western ECL Substrate 1705060 (Bio-Rad), инкубировали 5 минут, а затем фотографировали мембраны с помощью прибора ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad).

#### **6.1.5. Измерение концентрации мелатонина методом ИФА и дот-блоттинг**

В экспериментах с электроформованной НЦ в качестве анализата был выбран мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамиин, молекулярная масса 232 г/моль). Для определения количества мелатонина методом ИФА использовали коммерческий набор KSA908Gel1 компании Cloude-Clone Corp (USA). Реакции проводили в ячейках 96-луночного планшета или на поверхности НЦ мембран. В обоих случаях анализ включал в себя ряд шагов, которые обычно используют при конкурентном ИФА (Таблица 6). После каждого шага поверхность, на которой проводились реакции, отмывали.

В основе анализа лежит идея о том, что в каждый исследуемый раствор необходимо внести специальный реагент – биотинилированный конкурент. Это тройной конъюгат альбумина с мелатонином (МТ) и биотином. Он конкурирует с содержащимся в исследуемом растворе МТ за связывание с антителами, иммобилизованными на поверхности, а биотин, входящий в состав этого конъюгата, позволяет проявить его с помощью стандартных реагентов, таких как стрептавидин с пероксидазой хрена и субстраты для оптической детекции (колориметрической или хемилюминесцентной).

Для разведения реагентов использовали три буфера: фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7.4), фосфатно-солевой буфер с добавлением 0,075% Tween-20 (PBST), а также буфер с pH 9,5 для разведения антител (Coating buffer, Cloud-clone). Для блокировки неспецифических сайтов связывания использовали раствор Blocking buffer (Cloud-clone). Между инкубациями для удаления не связавшихся молекул твердый носитель отмывали в буфере PBST.

Таблица 6 – Основные шаги ИФА для определения МТ и использованные реагенты

| <b>Реагент (буфер, использованный для его разведения)</b>              | <b>Объём (мкл)</b> | <b>Концентрация</b>                                        | <b>Время</b> | <b>Количество отмывок</b> |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------|
| Улавливающие антитела (Coating buffer)                                 | 100                | 0,83 мкг/мл                                                | 1 час        | 1                         |
| Блокировочный раствор                                                  | 200                | -                                                          | 1 час        | 1                         |
| Калибровочный раствор, смешанный с биотинилированным конкурентом (PBS) | 50+50              | 0-250 пг/мл калибровочного раствора, 0,5 мкг/мл конкурента | 1 час        | 3                         |
| Стрептавидин-пероксидаза хрена (PBS)                                   | 100                | -                                                          | 30 минут     | 5                         |

В случае экспериментов в 96-луночном планшете все инкубации проводили в термостате при 37°C и покачивании с частотой 130 об/мин. Содержимое лунок удаляли декантацией. На заключительном этапе анализа в качестве субстрата пероксидазы хрена в каждую лунку вносили по 90 мкл тетраметилбензидина (ТМБ), инкубировали 15 минут, затем реакцию останавливали внесением 50 мкл 0.5 М серной кислоты.

Величину оптической плотности содержимого лунок планшета измеряли на фотометре (Hidex Chameleon, UK) при длине волны 450 нм.

В случае проведения анализа на мембранах инкубации проводили при комнатной температуре без покачиваний. Содержимое лунок удаляли, протягивая жидкость через мембрану с помощью насоса. На заключительном этапе результаты визуализировали с помощью хемилюминесцентного субстрата (Affinity ECL, ООО «БелкиАнтитела», РФ). Интенсивность хемилюминесценции измеряли на ChemiDoc (BioRad, USA).

### 6.1.6. Моделирование адсорбции аналита на мембрану

Для описания распределения аналита в мембране была предложена следующая модель. Мембрана может быть описана как область пространства с толщиной  $h$ , содержащая сайты связывания с объемной плотностью  $\Gamma_v$ , причем коэффициент диффузии аналита в этой области равен  $D_{eff}$ . Его можно оценить с помощью соотношения  $D_{eff} = \varepsilon D / 2$  [321], в котором  $D$  – коэффициент диффузии аналита в растворе вне мембраны,  $\varepsilon \sim 0.6-0.8$  – пористость мембраны.

Аналит в объеме мембраны может находиться в свободном состоянии либо быть связанным с сайтами связывания на поверхности волокон, соответствующие концентрации обозначены  $C$  и  $S$ . Движение аналита через мембрану может быть описано уравнением

$$\frac{\partial C(z, t)}{\partial t} + \frac{\partial S(z, t)}{\partial t} = D_{eff} \frac{\partial^2 C(z, t)}{\partial z^2} - U_{flow} \frac{\partial C(z, t)}{\partial z}$$

Предполагается, что скорость потока  $U_{flow}$  постоянна во времени и одинакова во всех участках мембраны, такое приближение иногда упоминается под термином “piston flow” [322]. В проведенных экспериментах диаметр мембраны  $d = 6$  мм  $\ll h = 100$  мкм, т.е. поперечными потоками можно пренебречь.

Для того чтобы учесть связывание (сорбцию) молекул аналита с поверхностью полимера, использовали модель Ленгмюра. В этой модели реакции адсорбции и десорбции описывают парой констант  $k_{on}$  и  $k_{off}$ :

$$\frac{\partial S(z, t)}{\partial t} = k_{on} C(z, t) (\Gamma_v - S(z, t)) - k_{off} S(z, t)$$

Предполагается, что сайты связывания равномерно распределены по всему объему мембраны, и  $\Gamma_v$  не зависит от  $z$ .

Начальные и граничные условия зависели от способа подачи растворов. Полученная система дифференциальных уравнений может быть решена численно, в

результате будут найдены функции  $C$  и  $S$ . Однако, в эксперименте измерение этих функций в абсолютных единицах затруднено. На практике проще измерить полное количество вещества, связанного с мембраной, которое может быть вычислено интегрированием:

$$S_{total}(t) = \frac{\pi d^2}{4} \int_0^h S(z, t) dz$$

Именно это значение фактически измеряется в экспериментах, и результат измерения можно сравнить с результатом расчета. Уравнения решали либо с помощью специализированного скрипта, написанного на Python, либо с помощью программы Mathematica.

## 6.2. Исследование адсорбции БСА на волокна ПДО

Для исследования неспецифической адсорбции белка на полимерные волокна был выбран БСА. Это стабильный, детально изученный белок, который часто используется в качестве компонента блокировочных растворов (в лабораторных анализах и биосенсорах) из-за способности неспецифически адсорбироваться на различные поверхности [323]. Для того, чтобы концентрацию аналита было удобнее измерять, использовали флуоресцентно меченый БСА: флуоресцентная метка (Cy3) несравненно меньше, чем молекула БСА, и можно считать, что она не влияет на адсорбцию. Калибровочная кривая, которую использовали для измерения концентрации БСА в растворах, показана на рисунке 86.

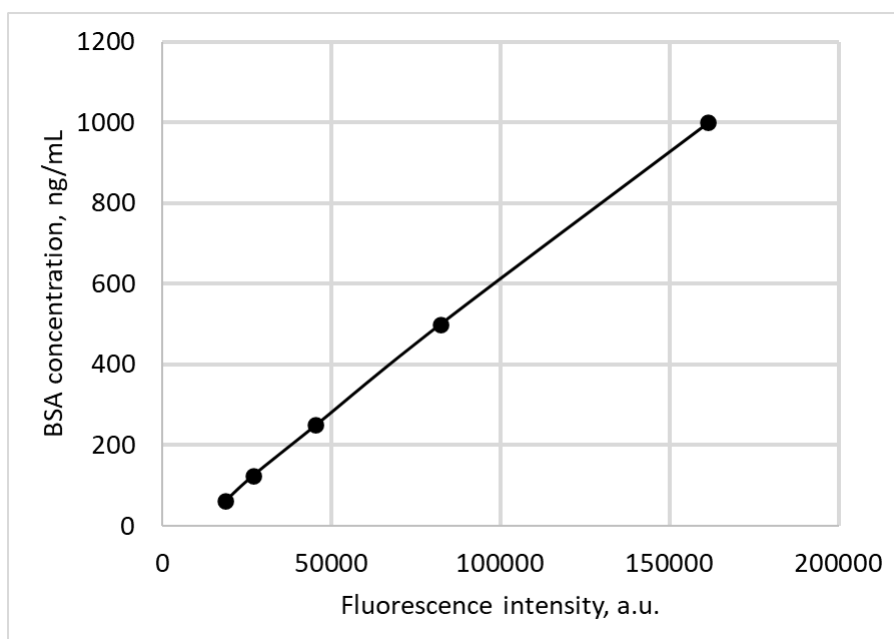


Рисунок 86 – Взаимосвязь между концентрацией раствора БСА, конъюгированного с красителем Cy3, и его флуоресценцией.

При контакте мембраны с раствором БСА часть молекул адсорбируется из раствора на мембрану. Эту адсорбцию можно характеризовать двумя способами: по убыли концентрации БСА в растворе или по количеству БСА, адсорбированному на мембране. Были экспериментально реализованы оба эти подхода, но первый оказался более информативным, т.к. с его помощью можно вычислить количество адсорбированного белка (или его долю относительно общего количества БСА в растворе). В то же время, при измерении флуоресценции мембран мы имели дело со сравнительно сложной системой: волокна могут скрывать молекулы, находящиеся в глубоких слоях мембраны, и делать их невидимыми для оптической детекции. Поэтому измерения флуоресценции мембран следует считать полуколичественными; измерять по ним абсолютное количество адсорбированного белка представляется некорректным.

На рисунке 87 представлены результаты измерения адсорбции двумя указанными способами. Эксперименты проводили для четырех концентраций БСА: 125, 250, 500 и 1000 нг/мл. Мембрану либо погружали в раствор, либо циклически пропускали его через мембрану, находящуюся в держателе. После эксперимента измеряли концентрацию БСА, оставшегося в растворе, и вычисляли массу адсорбированного белка; при обоих способах нанесения пробы на мембрану масса адсорбированного белка увеличивалась по мере увеличения его исходной концентрации. Наиболее важный вывод состоит в том, что при прокачке пробы через мембрану эта масса оказывалась в 2.8-11.5 раза больше, чем при инкубации мембраны в пробе (рисунок 87 А; в оригинальной статье [A30] эти результаты приводятся в виде зависимости доли поглощенного белка от концентрации раствора, а не его массы). Другими словами, при подаче раствора на мембрану под давлением, адсорбция происходила в 2.8-11.5 раз интенсивнее, чем при инкубации мембраны в растворе. Объемы растворов и время взаимодействия раствора с мембраной были одинаковы.

Интенсивная адсорбция БСА на мембрану была подтверждена измерениями интенсивности флуоресценции мембран (рисунок 87 Б). Те мембраны, на которые БСА был нанесен с помощью потока жидкости, флуоресцировали интенсивнее, чем те мембраны, которые были проинкубированы в растворе БСА. Кроме того, вне зависимости от способа нанесения при увеличении концентрации раствора возрастала яркость флуоресценции мембран. Этот результат представляется ожидаемым, и он описан для некоторых мембранных биосенсоров [188], [324], а также для отдельных электроформованных волокон [325].

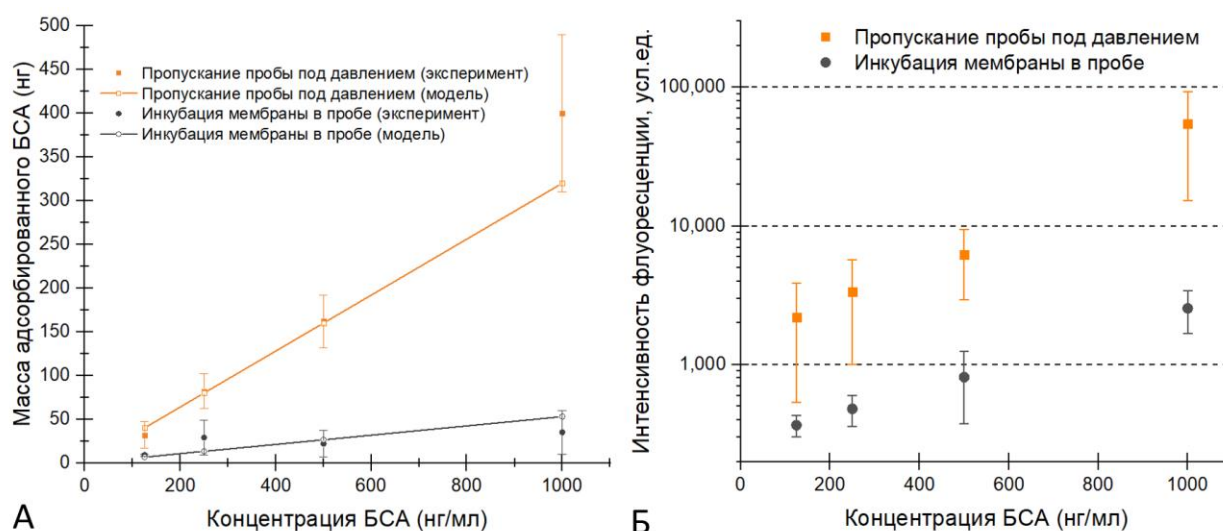


Рисунок 87 – Измерение адсорбции БСА на мембраны из ПДО. А – масса адсорбированного БСА как функция исходной концентрации БСА в растворе. Б – интенсивность флуоресценции мембран после контакта с растворами различной концентрации.

Когда раствор пропускали через мембрану с использованием разработанной проточной системы (рисунок 84 А), он контактировал с большой поверхностью трубок и соединений. Площадь, с которой контактировал раствор, была больше, чем внутренняя площадь стенки пробирки при инкубации мембраны в растворе. Если бы поверхности не были заблокированы, то можно было бы предположить, что убыль концентрации БСА в растворе (рисунок 87 А) связана с его адсорбцией на внутренней поверхности трубок. Чтобы исключить такую ситуацию, все поверхности (кроме мембран), которые в эксперименте контактировали с исследуемыми растворами, заранее блокировали, как описано выше. Кроме того, проводили контрольные эксперименты: пропускали раствор через трубки заблокированной проточной системы, в которой не было мембраны. Флуоресценция такого раствора не отличалась от флуоресценции исходного раствора, т.е. неконтролируемой адсорбции БСА на поверхности трубок и соединений не происходило.

В данном случае размер анализата (гидродинамический диаметр БСА составляет ~5 нм) значительно меньше характерного размера пор мембраны (~1 мкм). Таким образом, при пропускании раствора БСА через мембрану снижение концентрации БСА объясняется именно адсорбцией анализата на полимерные волокна, а не ситовой фильтрацией.

Перейдем к результатам моделирования и рассмотрим вначале сравнительно простой случай: будем предполагать, что резервуар белка, из которого происходит

адсорбция, бесконечен, и концентрация белка в нем не снижается по мере адсорбции. Соответственно, при пропускании раствора через мембрану под давлением мы также будем пренебрегать убылью концентрации – это соответствует подаче раствора из бесконечного резервуара, а не циклическому пропусканию, как в эксперименте. В расчетах толщина мембраны составляла  $h=100$  мкм, а объемная скорость потока  $Q \sim 110$  мкл/мин соответствовала линейной скорости  $U_{\text{flow}}=4Q/\pi d^2=0.39$  см/мин. Коэффициент диффузии БСА в воде при комнатной температуре составляет  $D=6 \cdot 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с [326], [327], и поэтому эффективный коэффициент диффузии в мембране можно оценить как  $D_{\text{eff}} \sim 2 \cdot 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с.

Два рассмотренные способа нанесения пробы на мембрану различались граничными условиями. В случае инкубации мембраны в пробе раствор поступает с обеих сторон мембраны, поэтому можно записать  $C(0,t)=C(h,t)=C_0$ . В случае пропускания раствора через мембрану под давлением со стороны поступления потока  $C(0,t)=C_0$ , а с обратной стороны, где поток покидает мембрану, в общем случае необходимо использовать граничное условие третьего рода  $\frac{\partial C}{\partial z} + \alpha C = 0$ . Однако при малом коэффициенте диффузии (для исследованных белков  $D_{\text{eff}} \sim 2 \cdot 5 \cdot 10^{-7}$  см<sup>2</sup>/с), и быстром потоке жидкости ( $U_{\text{flow}} \sim 6.5 \cdot 10^{-3}$  см/с) диффузионный поток на выходе из мембраны оказывается значительно меньше, чем адвективный. Диффузия становится значимой только на масштабе порядка  $D_{\text{eff}}/U_{\text{flow}} \sim 10^{-4}$  см, что значительно меньше толщины мембраны  $h \sim 10^{-2}$  см. Поэтому при моделировании экспериментальной системы выбор граничного условия на выходе из мембраны слабо влиял на результат (рисунок 88 А): относительные вариации  $S_{\text{total}}$  при изменении граничного условия на поверхности  $z=h$  составляли менее 0.5% (рисунок 88 Б). Фронт концентрации двигался через мембрану с настолько большой скоростью  $U_{\text{flow}}$ , что он размывался только за счет адсорбции, но не за счет диффузии. При большой  $U_{\text{flow}}$  можно пренебречь диффузионным слагаемым в уравнении, связывающем  $C$  и  $S$  – и значительно упростить расчет. Можно считать, что на выходе из мембраны профиль концентрации постоянный, т.е. выполняется граничное условия второго рода  $\frac{\partial C}{\partial z} = 0$ . Предполагается, что аналит покидает мембрану только путем адвекции, но практически не вымывается из нее за счет диффузии.

На рисунке 88 сопоставлены зависимости количества адсорбированного БСА от времени, вычисленные после решения системы уравнений в трех разных случаях: при

граничном условии первого рода  $C(z=h)=0$ , второго рода  $\frac{\partial C}{\partial z}(z=h)=0$  и третьего рода  $\frac{\partial C}{\partial z} + \alpha C = 0$ . Для граничного условия третьего рода выбрана константа  $\alpha = 10^5 \frac{D_{eff}}{U_{flow} L^2}$ .

Видно, что разница между этими зависимостями мала, т.к. она определяется лишь малой долей объема мембраны, расположенной непосредственно вблизи поверхности  $z=h$ , где поток покидает мембрану. В общем случае (при вариации  $U_{flow}$  и  $D_{eff}$  в широких пределах) при увеличении коэффициента диффузии или снижении скорости потока, размер этой области расширяется, однако детальный анализ этого эффекта здесь не приводится, т.к. в эксперименте использовали всегда одну и ту же скорость потока.

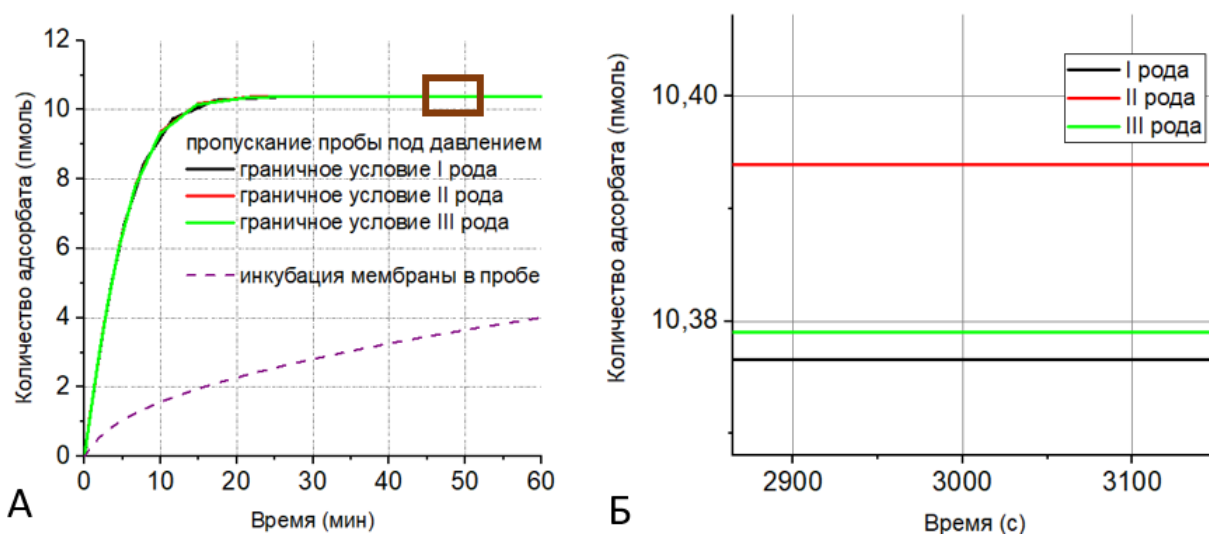


Рисунок 88 – Результаты моделирования адсорбции БСА на мембрану из ПДО (предполагается, что концентрация БСА вне мембраны составляет  $C_0=15$  нМ и не снижается). А – Зависимости  $S_{total}$  от времени, рассчитанные для разных способов нанесения пробы на мембрану и разных граничных условий. Б – увеличенный фрагмент графика А, иллюстрирующий влияние граничных условий при  $z=h$ .

Для вычисления зависимостей, показанных на рисунке 88, использованы константы адсорбции и десорбции, равные  $k_{on}=10^4$  (М·с) $^{-1}$ ,  $k_{off}=10^{-2}$  с $^{-1}$ . Они соответствуют константе диссоциации порядка  $K_d \sim 1$  мкМ, которая характерна для сильной неспецифической адсорбции [328]. Кроме того, для решения системы необходимо знать объемную концентрацию свободных сайтов связывания  $\Gamma_v$ . Ее можно оценить, как минимум, двумя способами. Удельная площадь поверхности электроформованных мембран обычно составляет порядка  $SSA_m \sim 10$  м $^2$ /г [180], [181]. Зная плотность ПДО  $\rho=1.318$  г/см $^3$  и пористость мембраны  $\varepsilon \sim 0.6$ , объемную концентрацию сайтов можно оценить как  $SSA_v = SSA_m \cdot \rho \cdot (1-\varepsilon) = 0.8 \cdot 10^5$  1/см (единицы измерения соответствуют соотношению площадь/объем). С другой стороны, можно исходить из диаметра волокон. В использованных мембранах средний диаметр волокон

составил  $d_f=400$  нм, поэтому пренебрегая площадью поверхности волокон, приходящейся на их пересечения, можно оценить  $SSA_v \sim 4\varepsilon/d_f = 0.6 \cdot 10^5$  1/см. Эти два варианта расчета дают близкие значения  $SSA_v$ . Далее, можно исходить из известной поверхностной концентрации сайтов связывания белков на гладкой поверхности  $b_s \sim 2 \cdot 10^{12}$  шт/см<sup>2</sup>. В результате получаем, что  $\Gamma_v = SSA_v \cdot b_s$  лежит в диапазоне  $(2-2.7) \cdot 10^{-4}$  М. В расчетах использовали значение  $\Gamma_v = 2.5 \cdot 10^{-4}$  М (иногда его варьировали, как будет описано ниже). При моделировании пропускания пробы под давлением в этих расчетах скорость потока  $U_{flow}$  принимали равной  $0.39$  см/мин  $= 6.5 \cdot 10^{-3}$  см/с, которая соответствует потоку жидкости в трубках, без учета пористости мембраны.

На рисунке 88 А видно, что при выбранных параметрах расчета в случае пропускания пробы через мембрану количества БСА хватает, чтобы привести мембрану в состояние насыщения, т.е. в такое состояние, в котором скорости адсорбции и десорбции совпадают. Однако при инкубации мембраны в пробе этого не происходило – количество адсорбированного белка росло сравнительно медленно. Наиболее детальную информацию о событиях, происходящих в мембране, можно получить при анализе зависимостей  $C(z,t)$  и  $S(z,t)$  как функциях двух переменных (Рисунок 89). В случае инкубации мембраны в растворе (Рисунок 89 А) аналит поступает в мембрану с обеих сторон – и по мере его поступления растет количество адсорбированного вещества. В случае пропускания раствора аналита под давлением (Рисунок 89 Б) при выбранной высокой скорости потока мембрана насыщается сравнительно быстро. Если в расчетах варьировать концентрацию  $C_0$  от 1 до 15 нМ (это близко к диапазону 62.5-1000 нг/мл, использованному в эксперименте), то наблюдается аналогичная закономерность.

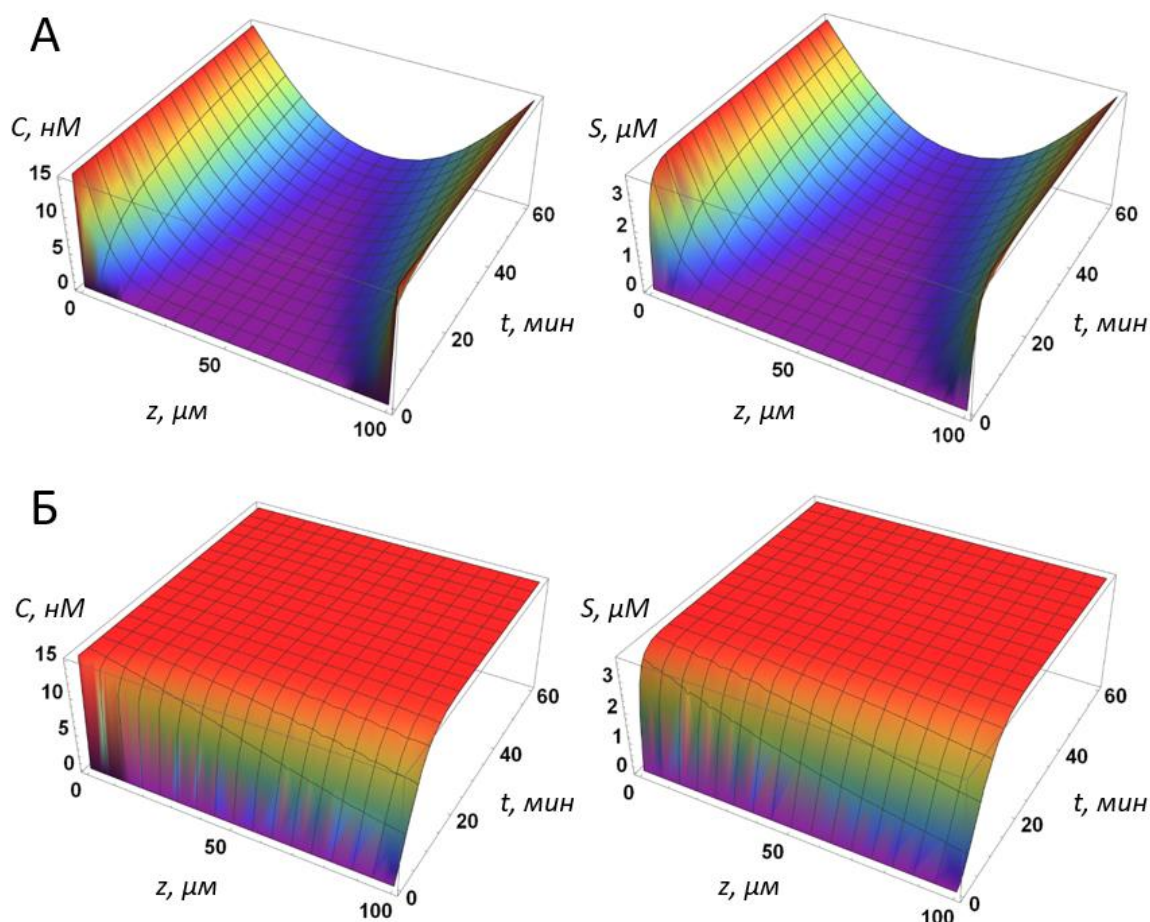


Рисунок 89 – Расчет количества свободного и адсорбированного вещества в мембране в случае бесконечного резервуара: А – инкубация мембраны в растворе, Б – пропускание раствора через мембрану под давлением.

Обсуждаемые результаты обладают еще одной важной особенностью: в расчетах получается  $S > C_0$ , т.е. объемная концентрация адсорбированного БСА больше концентрации свободного БСА (Рисунок 89). Это может показаться странным, но с точки зрения закономерностей адсорбции это объяснимо. При заполнении сайтов связывания на поверхности выполняется соотношение

$$\frac{N}{N_{max}} = \frac{S}{\Gamma_V} = \frac{C}{C + \frac{k_{off}}{k_{on}}}$$

Отсюда легко оценить соотношение  $\frac{S}{C} = \frac{\Gamma_V}{C + \frac{k_{off}}{k_{on}}} \approx \frac{\Gamma_V}{K_d}$ . При выбранных значениях

$\Gamma_V = 2.5 \cdot 10^{-4}$  М,  $k_{on} = 10^4$  (М·с)<sup>-1</sup>,  $k_{off} = 10^{-2}$  с<sup>-1</sup>,  $C \leq 15$  нМ можно пренебречь концентрацией в знаменателе в правой части равенства, и получаем  $S/C \sim 250$ . На качественном уровне это можно прокомментировать так: концентрация  $C$  мала, а объемная концентрация сайтов связывания велика, и они могут удерживать большое количество молекул, обеспечивая большую объемную концентрацию связанного анализита ( $S \sim 1$  мкМ при  $C_0 = 15$  нМ).

Итак, приведенные расчеты, выполненные в предположении бесконечного резервуара, позволяют проиллюстрировать, что при инкубации мембраны в растворе  $S_{total}(t=1 \text{ ч})$  в  $\sim 2.6$  раз меньше, чем при пропускании раствора под давлением, и это близко к экспериментально измеренному соотношению 2.8-11.5. Предложенная теоретическая модель подтверждает, что преодоление диффузионных ограничений за счет потока жидкости помогает усилить адсорбцию. Однако в экспериментах резервуар был конечным, и убыль количества аналита являлась ключевым экспериментально измеряемым параметром. Чтобы учесть это, необходимо использовать нелокальное граничное условие вида

$$C(0, t) = C_0 - \frac{\pi d^2}{4V_0} \int_0^h (C(z, t) + S(z, t)) dz$$

где  $V_0$  – объем внешнего резервуара. В случае инкубации мембраны в пробе стороны будут идентичны,  $C(0, t) = C(h, t)$ , а в случае пропускания пробы под давлением используем  $\frac{\partial C}{\partial z}(z=h) = 0$ , т.е. мембрана непроницаема для диффузии, и аналит покидает ее только путем адвекции.

При использовании такого граничного условия можно выбрать значения параметров ( $k_{on} = 4 \cdot 10^3 \text{ (М} \cdot \text{с)}^{-1}$ ,  $k_{off} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ ,  $D_{eff} = 8 \cdot 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$ ,  $\Gamma_V = 4 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ ,  $U_{flow} = 4Q/\pi d^2 = 0.01 \text{ см/мин}$ ), при которых общее количество адсорбированного вещества  $S_{total}$ , рассчитанное теоретически, будет близко к экспериментальным данным (теоретические точки на рисунке 87 А выше). В этом случае при пропускании пробы под давлением на мембрану адсорбируется в 5.95–6.05 раз больше БСА, чем при ее инкубации в растворе, что хорошо соответствует экспериментальным данным.

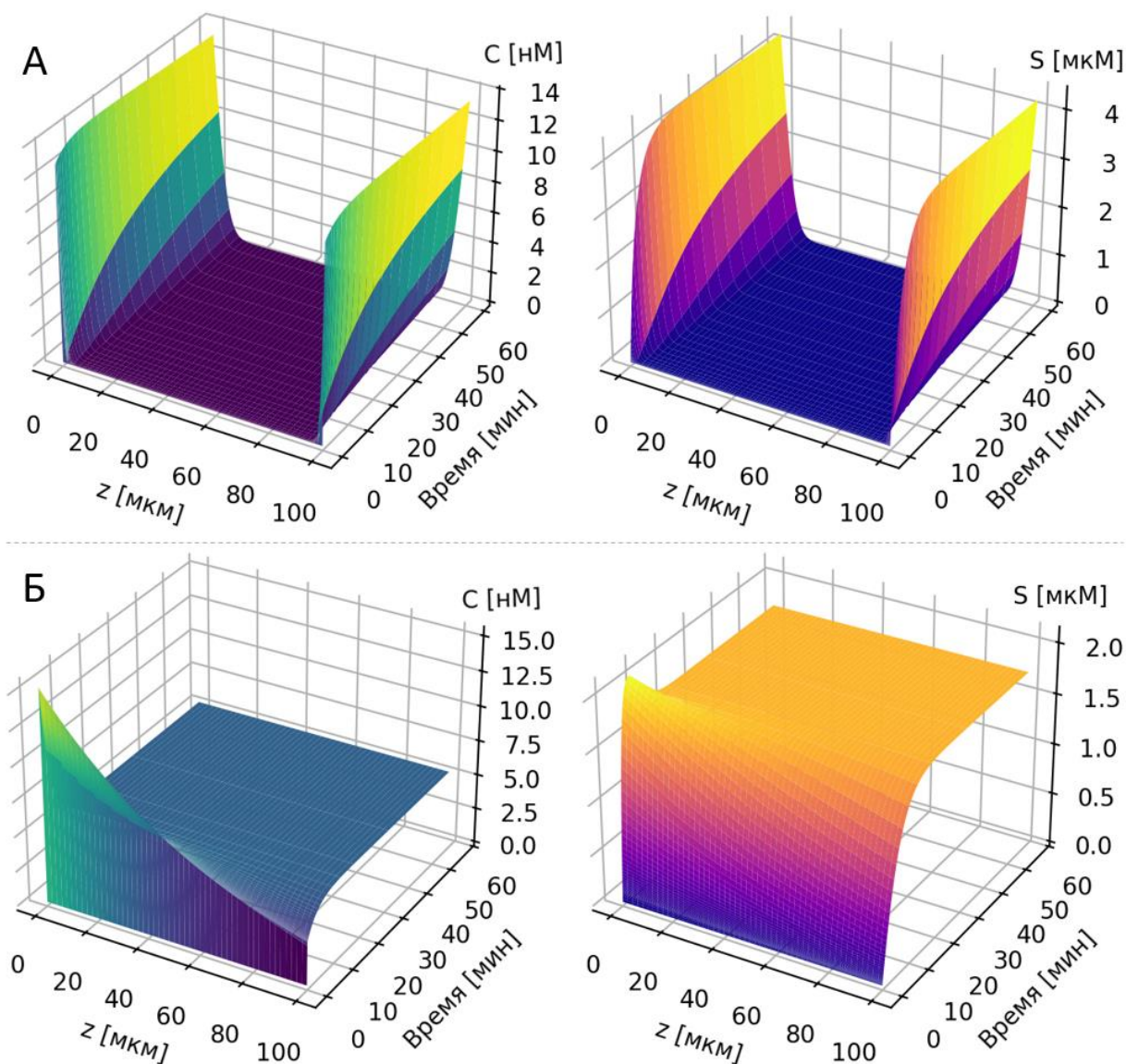


Рисунок 90 – Расчет количества свободного и адсорбированного вещества в мембране в случае конечного резервуара: А – инкубация мембраны в растворе, Б – пропускание раствора через мембрану под давлением. Начальная концентрация  $C_0=15.4$  нМ (1000 нг/мл).

Графики функций  $C(z,t)$  и  $S(z,t)$ , полученные при решении уравнений с нелокальным граничным условием представлены на рисунке 90 (А и Б соответственно для инкубации мембраны в пробе и пропускания пробы под давлением). В случае инкубации мембраны в пробе мы видим постепенное проникновение белка от поверхностных слоев в объем мембраны и его адсорбцию – ситуация аналогична той, которая получалась в приближении бесконечного резервуара  $C(0,t)=C(h,t)=C_0$ . Убыль концентрации в растворе, окружающем мембрану (т.е. постепенное снижение  $C(0,t)$  и  $C(h,t)$ ), проявляется сравнительно слабо – доля адсорбированного белка составляла приблизительно 6%. Если же рассматривать пропускание пробы под давлением, то

изменение граничного условия приводит к возникновению резких зубцов на зависимостях  $C$  и  $S$ , расположенных вблизи начала координат. В начальный момент времени там создается сравнительно высокая концентрация и свободного аналита, и адсорбированного. Это вызывает настолько заметное снижение концентрации аналита в движущейся пробе, что адсорбированный аналит начинает перераспределяться по толщине мембраны от входной стороны  $z=0$  к выходной  $z=h$ . Возможно, это удастся наблюдать экспериментально, если в различные моменты времени останавливать поток пробы – и исследовать мембрану с помощью КЛСМ, чтобы построить зависимость количества адсорбированного аналита от глубины (координаты  $z$ ).

Итак, пропускание раствора через мембрану имеет преимущество перед инкубацией мембраны в растворе. Это преимущество состоит в том, что поток жидкости помогает преодолеть диффузионные ограничения и обеспечить более интенсивную адсорбцию молекул аналита на мембрану; оно наблюдается экспериментально и подтверждается теоретическими оценками. В общем случае, если скорость потока  $U_{flow}$  мала, то эта закономерность может нарушаться, т.к. при инкубации мембраны в растворе аналит поступает с двух сторон, а при пропускании пробы под давлением – с одной стороны.

С точки зрения разработки биосенсоров описанные эксперименты являются предельно упрощенными, т.к. аналит (флуоресцентно меченый БСА) легко детектируется как в растворе, так и на мембране. Тем не менее, из них следует практически значимый вывод. Для нанесения молекул глобулярного белка на поверхность мембраны (например, молекул улавливающих антител или других молекул рецепторного слоя) целесообразно использовать проточную систему, т.е. модифицировать мембрану потоком жидкости, а не просто инкубировать мембрану в растворе. Такой способ модификации мембран был использован нами в экспериментах по созданию биосенсора на ИЛ16, описанных в следующем разделе.

### **6.3. Использование мембраны на основе ПДО как элемента биосенсора**

Электроформованная мембрана из ПДО может быть использована в качестве основы биосенсора. Чтобы продемонстрировать такую возможность, в качестве аналита был выбран интерлейкин-1 $\beta$  (ИЛ16). Это глобулярный белок, который существует в крови в двух формах – в виде предшественника  $Mw \sim 31-33$  кДа и зрелой формы  $Mw \sim 17.5$  кДа, и именно зрелая форма представляет наибольший интерес. ИЛ16 является

клинически значимым маркером воспаления, а измерение его концентрации в крови является важной диагностической задачей.

Для измерения концентрации ИЛ16 методом ИФА существуют коммерчески доступные наборы. Они работают по принципу классического ИФА: на подложке собирают «сэндвич» из улавливающих антител, аналита и проявляющих антител (для предотвращения неспецифического связывания используют блокировку). В данной работе использован набор реагентов PSA563Hu01 (Cloud-Clone Corp, Китай), предназначенный для выполнения ИФА в ячейках 96-луночного планшета. Его используют следующим образом: наносят на донышко планшета улавливающие антитела, затем пробу, содержащую ИЛ16, затем проявляющие антитела, конъюгированные с биотином (в промежутках между шагами поверхность отмывают и по необходимости блокируют). После этого их проявляют конъюгатами стрептавидина с пероксидазой хрена, добавляют субстрат (ТМВ), и измеряют поглощение (колориметрический сигнал). Типичная калибровочная кривая, полученная в таком эксперименте, представлена на рисунке 91.

Улавливающие антитела из указанного набора реагентов были адсорбированы на волокна мембраны из ПДО, а затем мембрана была заблокирована альбумином, чтобы избежать неспецифической адсорбции. Эти два шага полностью соответствуют тем шагам, которые выполняют при проведении обычного ИФА. После такой модификации поверхность волокон становится селективным сорбентом для ИЛ16. Подготовленные мембраны контактировали с растворами ИЛ16 либо путем инкубации в растворе, либо путем пропускания раствора через мембрану под давлением. Затем проводили обычный ИФА, чтобы измерить концентрацию ИЛ16 в тех растворах, которые контактировали с мембраной.

Основной экспериментальный результат, полученный в этой части работы, представлен на рисунке 92. При пропускании пробы через мембрану под давлением адсорбция происходила в 2.4-3.4 раза более интенсивно, чем при инкубации мембраны в пробе. Это соответствует общей идее о том, что пропускание пробы под давлением помогает молекулам аналита преодолевать диффузионные ограничения и связываться с адсорбционными сайтами (антителами) на поверхности волокон.

При разных способах нанесения пробы на мембрану использовали одинаковые объемы растворов ( $V=500$  мкл), но при пропускании пробы под давлением этот объем увеличивался приблизительно на  $\Delta V=50$  мкл буфера, а проба при этом разбавлялась. Это

происходило из-за того, что после блокировки и промывки в трубках проточной системы оставался буфер, и его объем было практически невозможно уменьшить ниже указанного  $\Delta V$ , не допуская высыхания мембран. Поэтому все точки, соответствующие пропусканию пробы под давлением, смещены влево от аналогичных точек, соответствующих инкубации мембраны в пробе (рисунок 92).

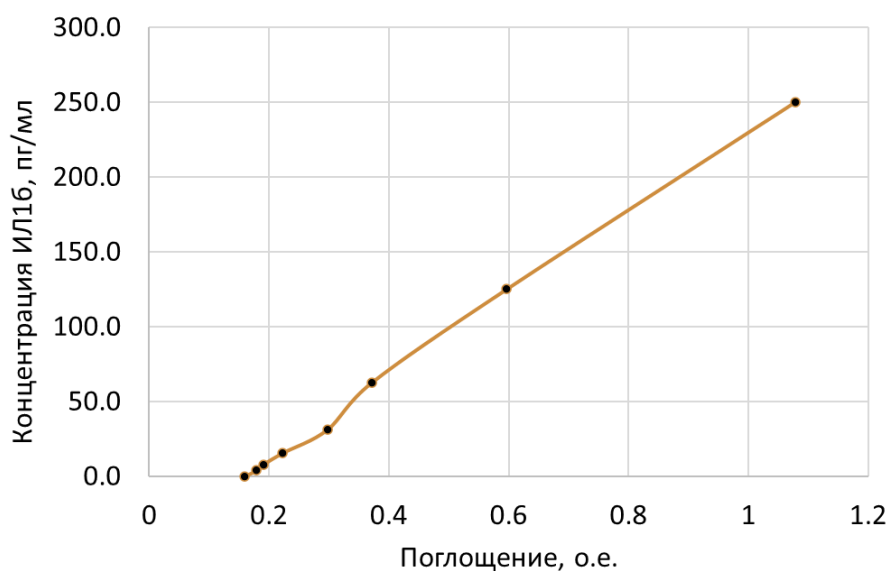


Рисунок 91 – Калибровочная кривая для измерения концентрации ИЛ16 в растворе с помощью набора PSA563Hu01 (Cloud-Clone Corp, Китай).

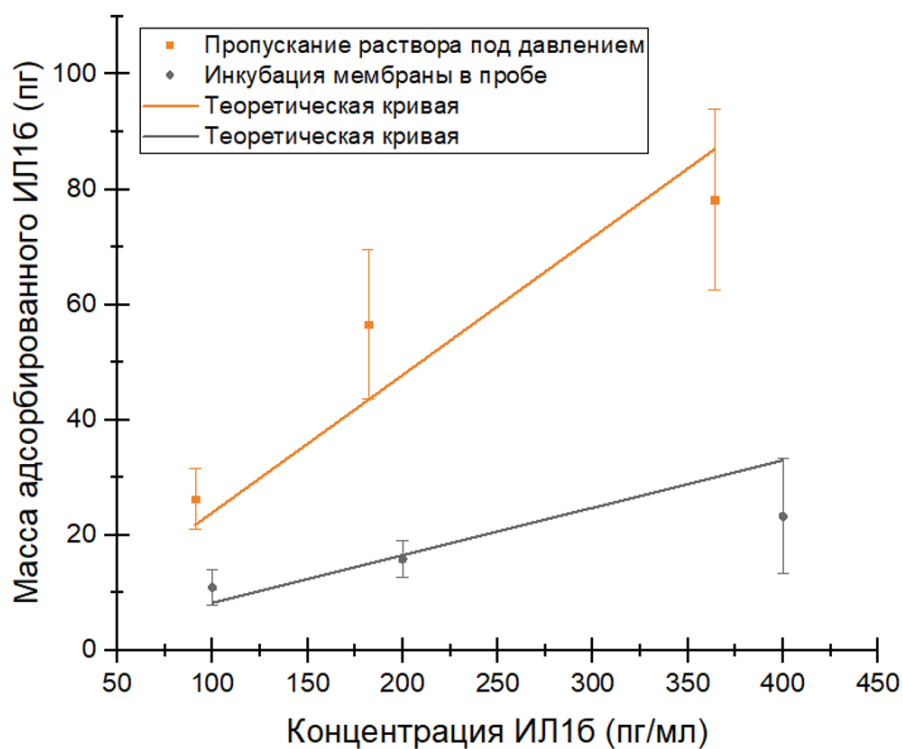


Рисунок 92 – Сравнение адсорбции ИЛ16 на мембраны из ПДО, модифицированные антителами, при разных способах нанесения пробы на мембрану.

Для того чтобы проявить ИЛ16, адсорбированный на мембрану, процедура обычного ИФА подходит не очень хорошо, т.к. изменение цвета ТМБ на мембране заметно сравнительно слабо. В данном случае вместо колориметрической детекции уместно использовать хемилюминесцентную или флуоресцентную. На мембрану наносили биотинилированные проявляющие антитела аналогично тому, как это делается при проведении ИФА в ячейках планшета. Далее с биотином связывались конъюгаты стрептавидина с флуоресцентным красителем, чтобы получить флуоресцентный сигнал, или конъюгаты стрептавидина с пероксидазой хрена. В последнем случае в качестве субстрата использовали не ТМБ, а высокоэффективный хемилюминесцентный субстрат (ECL), и регистрировали хемилюминесцентный сигнал от мембран.

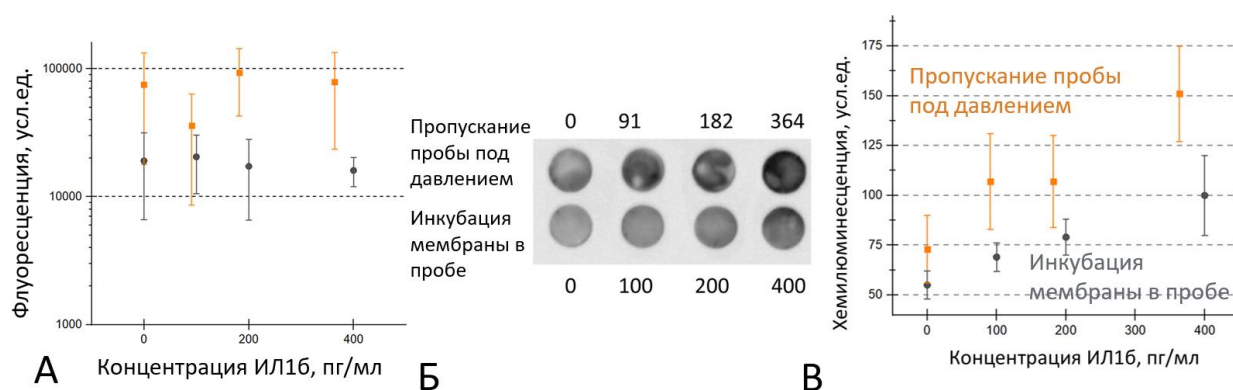


Рисунок 93 – Исследование связывания ИЛ16 антителами, иммобилизованными на мембранах из ПДО, с помощью оптических методов. А – флуоресцентные сигналы, полученные при использовании конъюгатов стрептавидина с красителем Alexa Fluor 594. Б – инвертированная фотография хемилюминесцентных сигналов, полученных при использовании конъюгатов стрептавидина с пероксидазой хрена и субстрата ECL.

Числа показывают концентрацию ИЛ16 в пг/мл. В – результаты измерения хемилюминесцентных сигналов от мембран.

Итак, чтобы подтвердить интенсивную адсорбцию ИЛ16 на мембраны, от них измеряли оптические сигналы – либо флуоресцентные (рисунок 93 А), либо хемилюминесцентные (рисунок 93 Б, В). Оба эти подхода подтвердили, что поверхность мембраны, на которую наносили ИЛ16 путем пропускания пробы под давлением, содержит больше адсорбированного ИЛ16, чем поверхность мембраны, на которую наносили пробу путем инкубации. Количественный анализ этих закономерностей затруднен по тем же причинам, что и в аналогичных экспериментах с БСА (рисунок 87 Б). Молекулы, испускающие свет, сложным образом расположены в толще мембраны, и верхние волокна мембраны могут мешать регистрации оптических

сигналов. По-видимому, эта особенность объясняет отсутствие увеличения яркости флуоресценции при увеличении количества ИЛ1б (рисунок 93 А).

Для моделирования специфического связывания необходимо изменить константы адсорбции и десорбции:  $k_{on}=2 \cdot 10^3 \text{ (M} \cdot \text{s)}^{-1}$ ,  $k_{off}=10^{-5} \text{ с}^{-1}$ , при этом константа диссоциации окажется  $K_D=5 \text{ нМ}$ . Эти значения соответствуют тем, которые характерны для взаимодействия антиген-антитело [329-332]. В экспериментах по специфическому связыванию концентрация ИЛ1б лежала в диапазоне 0-400 пг/мл (0-21.05 пМ). Она была значительно меньше, чем в экспериментах по неспецифической адсорбции БСА (для сравнения, на рисунке 88 представлены результаты расчета для концентрации БСА, равной  $C_0=15 \text{ нМ}$ , т.е. на три порядка выше, чем в экспериментах по специфическому связыванию). Параметр  $\Gamma_V$  был уменьшен до  $1.7 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ , т.е. сайты специфического связывания ИЛ1б формировали путем нанесения антител на волокна, и из общих соображений количество таких сайтов меньше, чем количество «универсальных» сайтов неспецифического связывания. Скорость потока составляла  $U_{flow}=4Q/\varepsilon\pi d^2=0.01 \text{ см/мин}$ , а коэффициент диффузии  $D_{eff}=7 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ . Как видно на рисунке 92 выше, рассчитанное при этих параметрах количество адсорбированного ИЛ1б хорошо соответствует экспериментальным наблюдениям.

Для концентрации ИЛ1б, равной 400 пг/мл (максимальной, использованной в эксперименте), рассмотрим более детально закономерности адсорбции, получаемые при решении уравнений модели (рисунок 94, А и Б соответствуют соответственно инкубации мембраны в пробе и пропусканию пробы под давлением). В расчете учтено, что при пропускании пробы через систему происходило ее разбавление буфером, который оставался в соединительных трубках после промывки.

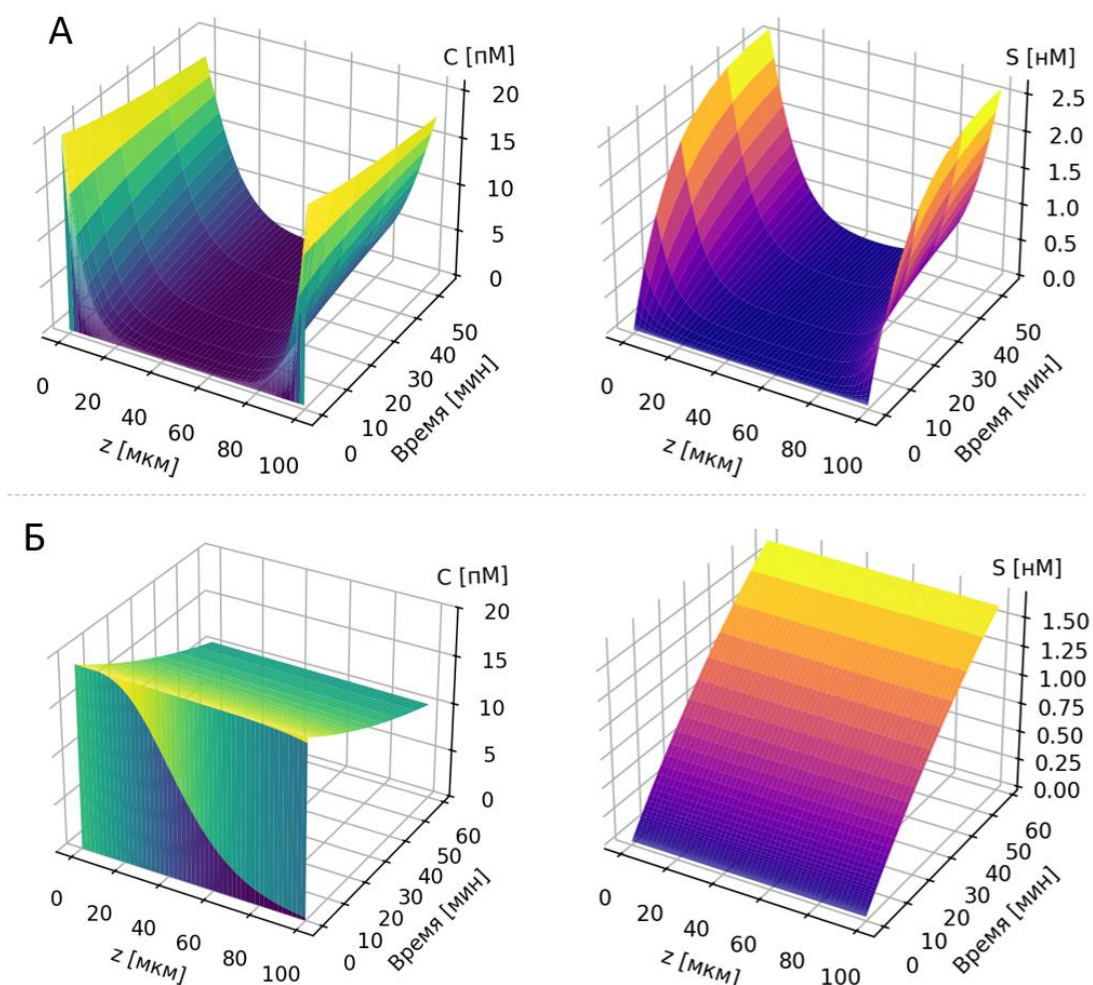


Рисунок 94 – Расчет количества свободного и адсорбированного ИЛ16 в мембране, способной к специфической адсорбции. Использована модель конечного резервуара. А – инкубация мембраны в растворе, начальная концентрация  $C_0=21.05$  пМ (400 пг/мл), объем пробы  $V=0.5$  мл. Б – пропускание раствора через мембрану под давлением,  $C_0=19.2$  пМ (364 пг/мл), объем пробы  $V=0.55$  мл.

В случае инкубации мембраны в пробе мы видим постепенное проникновение анализита в мембрану (рисунок 94 А). Это аналогично тому, как происходит проникновение и адсорбция БСА (неспецифическая, рисунок 90 А). При пропускании пробы под давлением наблюдается быстрое наполнение мембраны раствором и последующее плавное снижение концентрации за счет адсорбции. В отличие от случая неспецифической адсорбции (рисунок 90 Б), в этом расчете не достигается равновесие между свободным и адсорбированным анализитом, т.к. адсорбция происходит сравнительно медленно.

И для неспецифической адсорбции БСА, и для специфической адсорбции ИЛ16 были проведены эксперименты по регистрации оптических сигналов от мембраны (рисунок 87 Б и рисунок 93). Эти эксперименты, опираясь на сигнал от мембран (а не от

растворов), показывают, что при пропускании пробы под давлением адсорбция происходила более интенсивно. Однако если сравнить объемную плотность адсорбированного анализита  $S$  в поверхностных слоях мембраны, то по расчетам оказывается, что в случае инкубации мембраны в пробе она *выше*, чем при пропускании пробы под давлением. В случае инкубации анализит сосредоточен у внешних слоев мембраны, у ее поверхности, а в случае пропускания пробы под давлением он распределен в объеме мембраны более равномерно, и его приповерхностная концентрация ниже. Это расхождение может быть связано с неоптимальным выбором параметров моделирования (прежде всего, коэффициентов адсорбции-десорбции и коэффициента диффузии).

Может сложиться обманчивое впечатление, что пропускание пробы через мембрану под давлением является универсальным средством усиления адсорбции. В описанных экспериментах этот прием оказался эффективным вне зависимости от механизма адсорбции, но он не универсален. Если скорость потока мала и сопоставима со скоростью диффузионного движения, то пропускание не будет иметь преимущества перед инкубацией, т.к. при инкубации мембраны в пробе анализит поступает в нее с обеих поверхностей, а при использовании проточной системы – только с одной стороны. Если же скорость потока слишком велика, то можно ожидать деформации мембраны, схлопывания пор в ней и снижения количества свободных сайтов  $\Gamma_v$ . В данном случае все эксперименты были выполнены при одной и той же скорости потока, но в общем случае выбор оптимальной скорости является нетривиальной задачей.

Итак, в данном разделе были экспериментально и теоретически сопоставлены два способа нанесения проб на мембрану: путем пропускания пробы под давлением и путем инкубации мембраны в пробе. В обоих случаях пропускание пробы под давлением обеспечивало более интенсивную адсорбцию, чем инкубация, причем это справедливо как для неспецифической адсорбции, так и для специфического связывания (в случае если на волокнах мембраны иммобилизованы молекулы рецепторного слоя). Для теоретического описания процессов диффузии и адсорбции предложена модель, описываемая двумя дифференциальными уравнениями: модифицированным законом Фика и уравнением адсорбции. Результаты расчетов, выполненные с помощью этой модели, подтверждают экспериментальные закономерности.

#### 6.4. Электроформованные мембраны из нитроцеллюлозы и их использование в иммуноанализе

При рассмотрении электроформованных мембран как компонент биосенсоров нельзя обойти вопрос об их конкурентных преимуществах. Верно ли, что электроформованная мембрана, состоящая из тонких нановолокон, обладает преимуществами перед обычными, серийно выпускаемыми пористыми мембранами? Для ответа на этот вопрос необходимо сравнить результаты ИФА, выполненного на мембранах этих двух типов, причем они должны быть изготовлены из одного и того же материала. Такой эксперимент был выполнен с мембранами из нитроцеллюлозы (НЦ): были сопоставлены результаты ИФА для обнаружения мелатонина, выполненного на электроформованной мембране и на стандартной коммерчески доступной. Было показано, что эти две мембраны обеспечивают практически идентичные результаты – одинаковые значения чувствительности и динамического диапазона.

Коммерчески доступная мембрана из НЦ, использованная в этом эксперименте, имела эффективный диаметр пор, равный 0.45 мкм. Обычно его определяют по результатам теста на начало пузырения (на точку пузырька), который долгое время был стандартом для измерения пористости мембран [333]. В этом тесте через смоченную мембрану пропускают воздух, и измеряют давление  $P$ , при котором мембрана начинает пропускать пузыри, а затем по известному давлению вычисляют диаметр пор  $D$  по формуле

$$D = K \frac{4\gamma \cos\theta}{P}$$

где  $\gamma$  – коэффициент поверхностного натяжения жидкости,  $\theta$  – краевой угол смачивания,  $K$  – коэффициент, который зависит от формы пор. Для пор со сложной трехмерной структурой волюметрические методы измерения обычно более эффективны, чем микроскопия. По данным СЭМ (рисунок 95 А, В) коммерчески мембрана состояла из пор с характерным диаметром менее 1 мкм, разделенных стенками с толщиной  $300 \pm 100$  нм. Эту мембрану растворяли – и использовали полученный раствор для электроформования.

Количество статей, посвященных электроформованию НЦ, относительно мало [334], [335]. Это представляется особенно странным с учетом того, что именно в экспериментах с НЦ процесс электроформования был осуществлен впервые [59]. Электроформованная мембрана состояла из волокон со средним диаметром  $280 \pm 60$  нм (рисунок 95 Б, Г), и это близко к размеру границ между порами (толщине перегородок)

в обычной мембране. Оптимальные результаты электроспиннинга достигались при использовании двухкомпонентного растворителя, состоящего из смеси ацетона и ДМФА в соотношении 7:3 или 8:2 по объему. Аналогичный подход использовали в работе [336]. При попытке делать электроформование НЦ из раствора в ацетоне игла шприца быстро забивалась, и нам не удавалось получить нетканую мембрану, хотя такие эксперименты описаны в литературе [334], [335]. При использовании раствора НЦ в чистом ДМФА возникала иная проблема. ДМФА имеет сравнительно высокую температуру кипения 153°C и относится к нелетучим растворителям, он недостаточно быстро испарялся, и на коллекторе формировалась сплошная пленка. В результате оказалось, что двухкомпонентный растворитель был оптимальным и позволил получить тонкие волокна из НЦ. Мембраны двух описанных типов (рисунок 95) были использованы в экспериментах по дот-блоттингу.

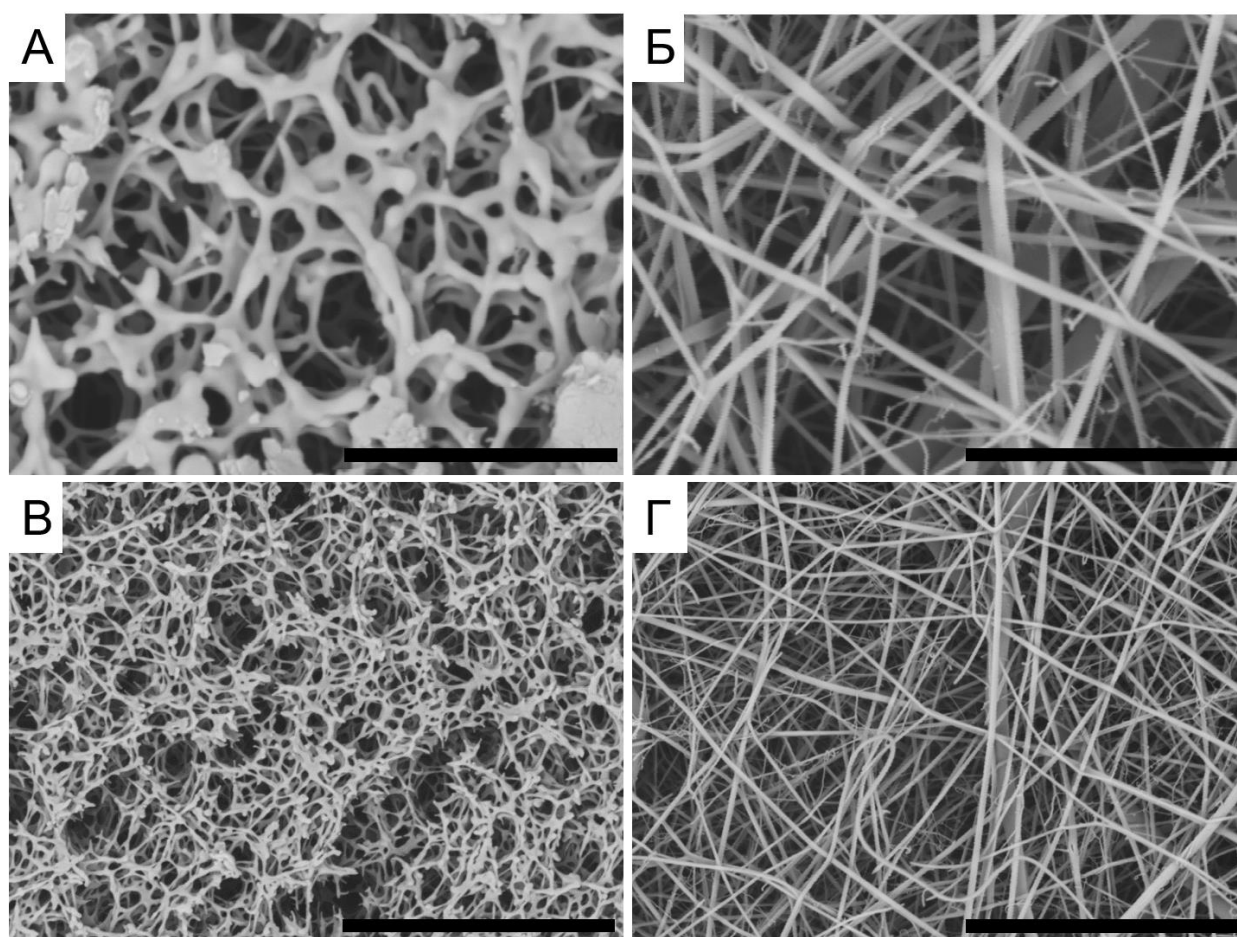


Рисунок 95 – СЭМ-изображения мембран из НЦ: коммерчески доступной (а, в) и электроформованной (б, г). Масштабная метка равна 5 мкм (а, б) и 10 мкм (в, г).

В качестве анализита в этой части работы был выбран мелатонин (МТ). Это гормон с молекулярной массой 232 г/моль, который отвечает за регуляцию цикла сна и

бодрствования. Обычно измерение МТ проводят с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС), именно этот анализ используют клиничко-диагностические лаборатории в России. В то же время существуют коммерчески доступные наборы для определения МТ методом ИФА. МТ является низкомолекулярным веществом, поэтому улавливающие антитела направлены не против него, а против его конъюгата с бычьим сывороточным альбумином, и этот же конъюгат используется в качестве стандарта. Анализ проводится конкурентным способом – в исследуемую пробу вносят биотинилированный конкурент, и МТ, находящийся в пробе, конкурирует с ним за связывание с антителами. Затем биотин можно проявить обычными инструментами, например, конъюгатами стрептавидина с пероксидазой хрена. Таким образом, в этом анализе используется необычный реагент – биотинилированный конъюгат альбумина и МТ. Типичная калибровочная кривая такого анализа, полученная в обычном 96-луночном планшете, представлена на рисунке 96 А – по мере увеличения концентрации МТ сигнал снижается.

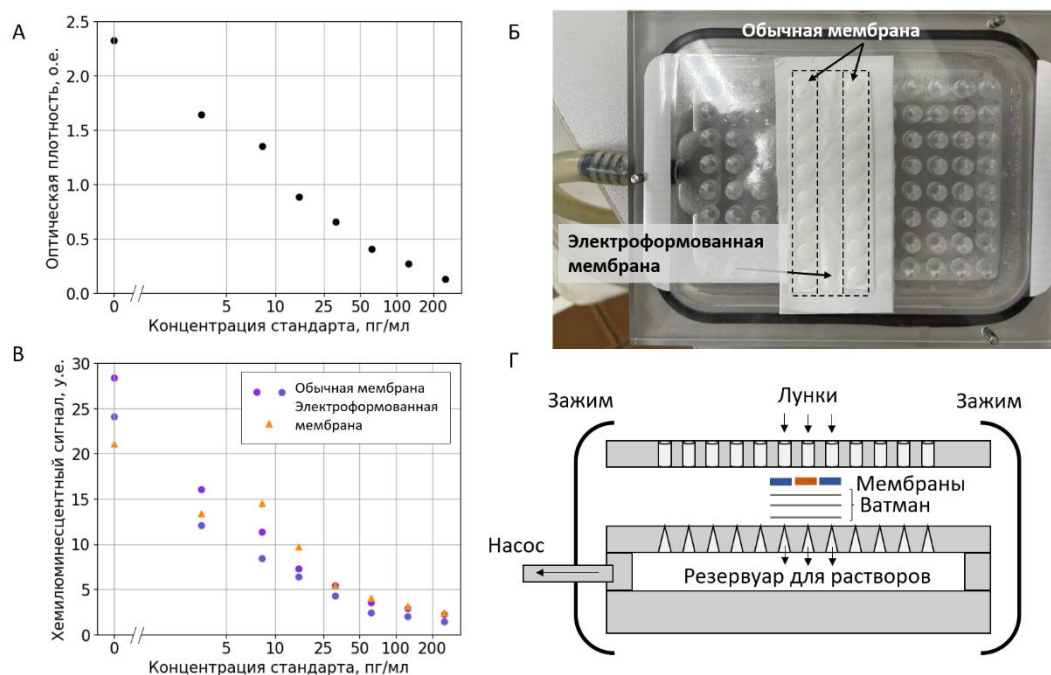


Рисунок 96 – Измерение концентрации МТ с использованием мембран из НЦ. А - калибровочная кривая ИФА на МТ, полученная в обычном планшете; использована колориметрическая детекция. Б – схема вакуумного зажима для дот-блоттинга. В – Калибровочные кривые ИФА на МТ, полученные при дот-блоттинге; использована хемилюминесцентная детекция. Г – схема размещения мембран в зажиме.

Реагенты из описанного набора были использованы для дот-блоттинга, с применением вакуумного зажима (рисунок 96 Б). Когда в нем размещена мембрана, он похож на 96-луночный планшет с проницаемым дном. Жидкость, внесенная в ячейки,

не протекает спонтанно, т.к. ее задерживает сила поверхностного натяжения. Однако при включении насоса возникает перепад давления, который заставляет жидкость просачиваться сквозь мембрану и собираться в резервуар, расположенный под ней. Скорость протекания жидкости через мембрану зависит не только от перепада давления, созданного насосом, но и от расположения ячейки в пределах зажима. Вероятно, вблизи патрубка для подключения насоса перепад давления выше, чем вдали от него. Поэтому чтобы сравнение двух типов мембран было корректно, их располагали в соседних рядах в центральной части зажима, причем ряд ячеек, закрытых электроформованной мембраной был между двумя рядами, закрытыми фабричной мембраной (рисунок 96 Б, Г). Такое размещение мембран позволило свести к минимуму вариации условий нанесения реагентов и сосредоточиться на свойствах мембран.

Калибровочные кривые, полученные с помощью обычной и электроформованной мембраны, сопоставлены на рисунке 96 В. Это убывающие кривые, аналогичные той, которая получена с помощью обычного ИФА (рисунок 96 А). Калибровочные кривые, полученные с помощью мембран двух типов, хорошо совпадают. Нам не удалось выявить явных различий ни в чувствительности, ни в ширине динамического диапазона. По-видимому, в данном случае структура нановолокон и имеющийся на них электростатический заряд слабо влияют на результаты анализа.

Таким образом, конкурентный ИФА на мелатонин был выполнен в варианте дот-блоттинга с использованием нитроцеллюлозных мембран двух типов – обычных, серийно выпускаемых, и электроформованных, состоящих из нановолокон. Оказалось, что использование мембран этих двух типов обеспечивает одинаковую чувствительность и одинаковый динамический диапазон иммуноанализа. Может оказаться, что при использовании другого рецепторного слоя (рассчитанного на другой анализ) ЭФ мембраны все-таки окажутся предпочтительными.

Итак, в данной главе рассмотрены возможности использования электроформованных мембран как элементов биосенсоров. Экспериментально показано, что пропускание пробы через мембрану под давлением позволяет усилить адсорбцию – по сравнению с нанесением пробы с помощью инкубации мембраны в растворе. Усиление адсорбции достигается за счет того, что поток жидкости помогает преодолевать диффузионные ограничения и обеспечивает более эффективный транспорт молекул аналита к сайтам связывания на поверхности волокон.

## Результаты и выводы

1. С помощью комплекса четырех методов (самосборки, селективного фотоотверждения, крейзинга и электроформования) были получены тонкие волокна более пятнадцати составов: из полиэфиров, нейлонов, полиолефинов, а также некоторых белков и пептидов. Размеры и морфология полученных волокон были качественно и количественно охарактеризованы методами микроскопии высокого разрешения.

2. Предложен методический подход к визуализации поверхности полимерных пленок, которые подвергались деформации по механизму крейзинга в адсорбционно-активной среде, методом АСМ. Он позволяет измерить параметры фибриллярно-пористой структуры; его особенность состоит в том, что при измерении пленка находится в растянутом состоянии, а исследование проводится в той же среде, в которой происходила деформация, и это необходимо для визуализации нативной структуры.

3. Предложена оригинальная методика корреляционной микроскопии СЭМ-КЛСМ, которая позволяет исследовать один и тот же участок образца, содержащего флуоресцентную метку, методами СЭМ и КЛСМ последовательно. Данные о диаметрах электроформованных волокон фиброина шелка, измеренные методами СЭМ и КЛСМ, хорошо согласуются между собой (коэффициент корреляции  $r=0.97$ ), что иллюстрирует возможность использования КЛСМ для характеристики структуры электроформованных мембран.

4. На примере трехкомпонентной системы ПЛА-БСА-ГФИП качественно и количественно проанализирована зависимость морфологии электроформованной мембраны от концентрации и состава смеси, подвергаемой электроспиннингу. При малых концентрациях смеси на коллекторе формируются отдельные гранулы или «бусины на нити», затем при повышении концентрации начинают формироваться волокна цилиндрической формы и при дальнейшем увеличении концентрации – ленты, причем эта закономерность наблюдается как для гомогенных растворов ПЛА или БСА, так и для гетерогенных смесей ПЛА и БСА.

5. При электроформовании несовместимых полимер-белковых смесей, приготовленных в общем растворителе, в одном волокне могут быть совмещены обе компоненты – полимер и белок. Это подтверждено методами рентгеновского микроанализа, флуоресцентной микроскопии и КР-спектроскопии. Для системы ПЛА-БСА-ГФИП продемонстрирована взаимосвязь между однородностью смеси, подвергаемой электроспиннингу, и однородностью пространственного распределения компонент в волокнах. Электроформованные мембраны, изготовленные из полимер-

белковых смесей (ПЛА-БСА, ПОБВ-БСА), способны в течение длительного времени высвободить белок при инкубации в водной среде.

6. Растяжение электроформованной мембраны из полилактида в спирте позволяет получить ориентированные волокна (фактор ориентации  $f_g=0.92$ ), причем более эффективно, чем при использовании традиционного «метода зазора» (фактор ориентации  $f_g=0.7$ ). При культивировании клеток на полимерных волокнах, выстроенных вдоль одного направления, наблюдается контактное ориентирование.

7. Пропускание раствора белка через электроформованную мембрану под давлением обеспечивает более интенсивную адсорбцию белка на волокна, чем инкубация мембраны в растворе. Это продемонстрировано как для неспецифической адсорбции (на примере альбумина), так и для специфического связывания (на примере интерлейкина-1 бета), что открывает путь к повышению чувствительности биосенсоров. Для теоретического описания этого эффекта предложена модель диффузии-адсорбции; расчёты по этой модели согласуются с экспериментальными данными и подтверждают высокую эффективность адсорбции белка на мембрану из потока жидкости.

## **Заключение**

Если рассматривать тонкое полимерное волокно как специфический природный или искусственно созданный объект, то ясно, что волокна чрезвычайно разнообразны как по химическому составу, так и по укладке молекул в волокне. Морфологическая особенность (большое соотношение длины к диаметру) позволяет рассматривать волокна как определенный класс объектов, но внутри этого класса присутствует колоссальное разнообразие. При этом для измерения размеров тонких волокон и описания их морфологии практически всегда используется микроскопия высокого разрешения, и поэтому в данной работе микроскопическим измерениям отводится особое внимание.

Комплекс подходов к формированию волокон, описанный в данной работе, может использоваться при разработке биомедицинских изделий из биоразлагаемых полимеров – раневых покрытий, заготовок для тканеинженерных конструкций, имплантов и других. Центральное место в этом комплексе занимает электроформование, но ожидается, что развитие и удешевление технологий трехмерной печати будет смещать фокус в сторону селективного фотоотверждения и смежных технологий, т.к. они обеспечивают наилучший контроль пространственного расположения элементов. При этом независимо от способа получения изделия, остаются открытыми биомедицинские вопросы, связанные с их витализацией (внесением клеток на полимерный каркас), контролем их состояния при культивировании, медицинскими свойствами – и эти вопросы наверняка будут предметом активного изучения в ближайшие годы.

Выполненная работа связана и с другими научными и технологическими вопросами – перечислим некоторые из них. В разделе про самосборку пептидов описаны амилоидоподобные фибриллы, которые являются биосовместимыми и биоразлагаемыми, несмотря на сходство с амилоидами. Молекулярные причины, которые определяют возможность деградации или, наоборот, стабильность волокна в организме, в настоящее время остаются неясными. Раздел, посвященный крейзингу, также связан с целым рядом открытых вопросов. Например, как соотносятся механические свойства отдельных фибрилл и отдельных ламелей? Как именно изменяется структура крейзованного полимера на молекулярном уровне при удалении ААС и при удалении или изменении механической нагрузки?

Для многокомпонентных электроформованных мембран актуален вопрос о том, как компоненты расположены в пределах волокна и как можно управлять их расположением. Для электроформования в целом очень актуальна технологическая

задача снятия заряда с формирующейся мембраны, чтобы накопление заряда не ограничивало ее толщину. Для сенсорных приложений электроформованных мембран актуально развитие систем, которые будут использовать не оптическую, а принципиально другую детекцию (например, магнитную, основанную на суперпарамагнитных метках), чтобы в полной мере раскрыть потенциал электроформованных мембран с нанесенными на них белками как иммуносорбентов.

Оригинальные методики микроскопии, развитые в данной работе, прежде всего, корреляционная микроскопия СЭМ-КЛСМ, могут использоваться для широкого круга объектов. Она может быть особенно полезна в тех случаях, когда морфология объекта не позволяет однозначно идентифицировать его при измерении методом СЭМ, а флуоресцентный сигнал, полученный КЛСМ, помогает преодолеть это ограничение.

В целом, эксперименты, описанные в данной работе, вносят вклад в развитие науки о полимерах и нанотехнологии и расширяют современные представления о возможностях изготовления и использования тонких полимерных волокон.

## **Благодарности**

Выражаю глубокую благодарность своим наставникам, у которых мне посчастливилось учиться: моему научному консультанту профессору Константину Вольдемаровичу Шайтану (биологический факультет МГУ) – за то, что он вырастил меня как профессионального исследователя, и Дмитрию Владимировичу Клинову (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России им. Ю.М.Лопухина) – за то, что он привел меня в мир электроформования. Огромное Вам спасибо за многолетнюю поддержку, мудрые советы и бесценное обучение!

Благодарю своих коллег и соавторов, с которыми мне посчастливилось сотрудничать и выполнять проекты, результаты которых вошли в эту работу. Особенно хочу поблагодарить Алену Юрьевну Ярышеву (вместе с ней мы занимались исследованиями крейзинга полимеров) и Елизавету Робертовну Павлову (вместе с ней мы выполняли наиболее сложные эксперименты по электроформованию). Хочу также поблагодарить А.С.Богданову, Л.М.Ярышеву, А.М.Мойсенович, А.А.Пирязева, Д.А.Иванова, А.П.Бонарцева, К.А.Прусакова, А.А.Маслакову, Ю.С.Газизову, Т.В.Митько, И.В.Бессонова, А.А.Рамонову, С.В.Замалутдинову и других соавторов.

Большое спасибо моим ученикам – студентам и аспирантам, которые внесли вклад в результаты, представленные в данной работе: И.И.Никишину, А.Е.Сидоровой, А.И.Соколовой, С.В.Перуновой и П.А.Петровой.

И, конечно, огромная благодарность всем сотрудникам кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ и лаборатории медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России им. Ю.М.Лопухина за помощь и поддержку.

Работы, описанные в данной диссертации, были поддержаны рядом российских грантов, в том числе грантами Российского научного фонда (проекты 17-75-30064, 19-74-00037, 21-74-10042).

## Список публикаций по теме диссертации

*Статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, а также в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения (физико-математические науки):*

[A1] Bagrov D. Morphology and aggregation of RADA-16-I peptide Studied by AFM, NMR and molecular dynamics simulations / Bagrov D., Gazizova Y., Podgorsky V., Udovichenko I., Danilkovich A., Prusakov K., Klinov D. // Peptide Science.— 2016.— Vol. 106. № 1.— pp. 72–81. EDN: WVVVEF. Импакт-фактор 1,9 (JIF), 0.625 печ.л., авторский вклад 0.6.

[A2] Bagrov D. V. Fabrication of hydrogel scaffolds via photocrosslinking of methacrylated silk fibroin / Bessonov I. V., Rochev Y. A., Arkhipova A. Y., Kopitsyna M. N., Bagrov D. V., Karpushkin E. A., Bibikova T. N., Moysenovich A. M., Soldatenko A. S., Nikishin I. I., Kotliarova M. S., Bogush V. G., Shaitan K. V., Moisenovich M. M. // Biomededical Materials.— 2019.— Vol. 14. № 3.— P. 034102. EDN: MIKTBY. Импакт-фактор 3,9 (JIF), 1 печ.л., авторский вклад 0.1.

[A3] Багров Д. В. Фотоотверждаемые гидрогели, содержащие спидроин или фиброин / Бессонов И. В., Котлярова М. С., Копицына М. Н., Федулов А. В., Мойсенович А. М., Архипова А. Ю., Богущ В. Г., Багров Д. В., Рамонова А. А., Машков А. Е., Шайтан К. В., Мойсенович М. М. // Вестник Московского Университета. Серия 16 Биология.— 2018.— Том. 73. № 1.— с. 29–33. EDN: YMCDGZ. Импакт-фактор 0,443 (РИНЦ), 0.25 печ.л., авторский вклад 0.1.

Bagrov D. V. Photocurable Hydrogels Containing Spidroin or Fibroin / Bessonov I. V., Kotliarova M. S., Kopitsyna M. N., Fedulov A. V., Moysenovich A. M., Arkhipova A. Yu., Bogush V. G., Bagrov D. V., Ramonova A. A., Mashkov A. E., Shaitan K. V., Moisenovich M. M. // Moscow University Biological Sciences Bulletin.— 2018.— Vol. 73. № 1.— pp. 24–27. EDN: XXXHLV. Импакт-фактор 0,161 (SJR), 0.25 печ.л., авторский вклад 0.1.

[A4] Bagrov D. V. Atomic force microscopic study of the structure of high-density polyethylene deformed in liquid medium by crazing mechanism / Bagrov D. V., Yarysheva A. Y., Rukhlya E. G., Yarysheva L. M., Volynskii A. L., Bakeev N. F. // Journal of Microscopy.— 2014.— Vol. 253. № 2.— pp. 151–160. EDN: SKLEJR. Импакт-фактор 1,9 (JIF), 0.6 печ.л., авторский вклад 0.5.

[A5] Багров Д. В. Первое прямое микроскопическое исследование крейзованной структуры полимера, стабилизированной жидкой средой / Ярышева А. Ю., Багров Д. В., Рухля Е. Г., Ярышева Л. М., Волынский А. Л., Бакеев Н. Ф. // Доклады Академии Наук.— 2011.— Том. 440. № 5.— с. 655–657. EDN: OJHHEN. Импакт-фактор 0,932 (РИНЦ), 0.18 печ.л., авторский вклад 0.4.

Bagrov D. V. First direct microscopic study of the crazed polymer structure stabilized by a liquid medium / Yarysheva A. Yu., Bagrov D. V., Rukhlya E. G., Yarysheva L. M., Volynskii A. L., Bakeev N. F. // Doklady Physical Chemistry.— 2011.— Vol. 440. № 2.— pp. 198–200. EDN: PEFKDR. Импакт-фактор 1,1 (JIF), 0.18 печ.л., авторский вклад 0.4.

[A6] Bagrov D. V. The structural evolution of high-density polyethylene during crazing in liquid medium / Yarysheva A. Yu., Rukhlya E. G., Yarysheva L. M., Bagrov D. V., Volynskii A. L., Bakeev N. F. // European Polymer Journal.— 2015.— Vol. 66.— pp. 458–469. EDN: UFQKPX. Импакт-фактор 6,8 (JIF), 0.6 печ.л., авторский вклад 0.3.

[A7] Bagrov D. V. Which way do fibrils disappear? / Yarysheva A. Yu., Bagrov D. V., Kechek'yan P. A., Rukhlya E. G., Bakirov A. V., Yarysheva L. M., Chvalun S. N., Volynskii A. L. // Polymer.— 2019.— Vol. 169.— pp. 234–242. EDN: UDQZST. Импакт-фактор 7,4 (JIF), 1 печ.л., авторский вклад 0.3.

[A8] Bagrov D. V. Effect of initial polypropylene structure on its deformation via crazing mechanism in a liquid medium / Yarysheva A. Yu., Bagrov D. V., Bakirov A. V., Yarysheva L. M., Chvalun S. N., Volynskii A. L. // European Polymer Journal.— 2018.— Vol. 100.— pp. 233–240. EDN: XXDBFR. Импакт-фактор 6,8 (JIF), 0.4 печ.л., авторский вклад 0.3.

[A9] Bagrov D. V. Polyethylene–Poly(ethylene oxide) Hybrid Films Obtained by Crazing and Their Structural Peculiarities / Yarysheva A. Y., Bagrov D. V., Bakirov V. A. V., Tarasevich B. N., Grohovskaya T. E., Yarysheva L. M., Chvalun S. N., Volynskii A. L. // Macromolecules.— 2017.— Vol. 50. № 7.— pp. 2881–2888. EDN: RGVYDI. Импакт-фактор 5,7 (JIF), 0.4 печ.л., авторский вклад 0.15.

[A10] Bagrov D. Breathable Materials and Hybrid Nanocomposites with Antimicrobial Activity Based on Porous Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Obtained via Environmental Crazing / Yarysheva A., Khavpachev M., Bagrov D., Bakirov A., Efimov A., Trofimchuk E., Chvalun S. // Macromolecular Materials and Engineering.— 2020.— Vol. 306. No. 3.— P.2000636. EDN: DJUUZU. Импакт-фактор 5,2 (JIF), 0.5 печ.л., авторский вклад 0.1.

[A11] Багров Д. В. Структура и свойства нанокомпозитов полипропилена с поливиниловым спиртом, полученных методом крейзинга / Ярышева А. Ю., Звонова А.

А., Тюбаева П. М., Багров Д. В., Ярышева Л. М., Аржакова О. В. // Высокомолекулярные Соединения. Серия А.— 2023.— Том. 65. № 3.— с. 205–211. EDN: ZGVGNU. Импакт-фактор 0,91 (РИНЦ), 0.375 печ.л., авторский вклад 0.15.

Bagrov D. V. Structure and Properties of Polypropylene Nanocomposites with Poly(Vinyl Alcohol) Prepared via Crazing / Yarysheva A. Yu., Zvonova A. A., Tyubaeva P. M., Bagrov D. V., Yarysheva L. M., Arzhakova O. V. // Polymer Science Series A.— 2023.— Vol. 65. № 3.— pp. 274–279. EDN: JZBYEM. Импакт-фактор 1,2 (JIF), 0.375 печ.л., авторский вклад 0.15.

[A12] Багров Д. В. Особенности делокализованного крейзинга полиэтилена высокой плотности в растворах полиэтиленоксида / Ярышева А. Ю., Багров Д. В., Рухля Е. Г., Ярышева Л. М., Волынский А. Л., Бакеев Н. Ф. // Высокомолекулярные Соединения. Серия А.— 2012.— Том. 54. № 10.— с. 1507–1515. EDN: PBWEFR. Импакт-фактор 0,91 (РИНЦ), 0.5 печ.л., авторский вклад 0.15.

Bagrov D. V. Features of the delocalized crazing of high-density polyethylene in poly(ethylene oxide) solutions / Yarysheva A. Yu., Bagrov D. V., Rukhlya E. G., Yarysheva L. M., Volynskii A. L., Bakeev N. F. // Polymer Science Series A.— 2012.— Vol. 54. № 10.— pp. 779–786. EDN: RGJYIP. Импакт-фактор 1,2 (JIF), 0.5 печ.л., авторский вклад 0.15.

[A13] Bagrov D. V. Mechanical properties and morphology of electrospun mats made of poly ( $\omega$ -pentadecalactone) / Pavlova E. R., Nifant'ev I. E., Minyaev M. E., Bagrov D. V., Klinov D. V. // Journal of Physics: Conference Series.— 2019.— Vol. 1310. P. 012013.— EDN: KWKFGN. Импакт-фактор 0,18 (SJR), 0.3 печ.л., авторский вклад 0.2.

[A14] Bagrov D. V. Dye adsorption onto electrospun films made of polylactic acid and gelatin / Sokolova A. I., Pavlova E. R., Bagrov D. V., Klinov D. V., Shaitan K. V. // Molecular Crystals and Liquid Crystals.— 2018.— Vol. 669. № 1.— pp. 126–133. EDN: DPWJWW. Импакт-фактор 0,7 (JIF), 0.4 печ.л., авторский вклад 0.25.

[A15] Bagrov D. Comparison of the Electrospun Mats Made of Polylactide and Polydioxanone / Bogdanova A., Pavlova E., Polyanskaya A., Monakhova K., Volkova M., Biryukova E., Filkov G., Trofimenko A., Durymanov M., Kovaleva E., Rybalkin S., Piryazev A., Ivanov D., Klinov D., Bagrov D. // Journal of Polymers and the Environment.— 2025.— Vol. 33. № 7.— P. 3109–3123. EDN: USBIEP. Импакт-фактор 5,6 (JIF), 0.85 печ.л., авторский вклад 0.2.

[A16] Bagrov D. Wetting of electrospun nylon-11 fibers and mats / Bagrov D., Perunova S., Pavlova E., Klinov D. // RSC Advances.— 2021.— Vol. 11. № 19.— pp. 11373–11379. EDN: PJYEOR. Импакт-фактор 6,1 (JIF), 0.35 печ.л., авторский вклад 0.6.

[A17] Багров Д. В. Корреляционная микроскопия СЭМ-КЛСМ и ее применение для исследования электроформованных волокон желатина / Багров Д. В., Павлова Е. Р., Богданова А. С., Мойсенович А. М., Митько Т. В., Рамонова А. А., Клинов Д. В. // Наноиндустрия.– 2024.–Том. 17. № 3–4– с. 208–219. EDN: IQNVWK. Импакт-фактор 0,18 (РИНЦ), 0.6 печ.л., авторский вклад 0.6.

[A18] Багров Д. В. Измерение адсорбции антител класса IgG на электроформованные мембраны из нейлона-6 / Сенковенко А. М., Мойсенович А. М., Маслакова А. А., Павлова Е. Р., Багров Д. В. // Биофизика.– 2022.– Том. 67. № 3.– с. 555–561. EDN: AOOXHP. Импакт-фактор 0,593 (РИНЦ), 0.3 печ.л., авторский вклад 0.4.

Bagrov D. V. Measurements of IgG Antibodies Adsorption onto Electrospun Nylon-6 Membranes / Senkovenko A. M., Moysenovich A. M., Maslakova A. A., Pavlova E. R., Bagrov D. V. // Biophysics.– 2022.– Vol. 67. № 3.– pp. 440–444. EDN: GZGTJS. Импакт-фактор 0,197 (SJR), 0.3 печ.л., авторский вклад 0.4.

[A19] Багров Д. В. Структурная модель электроформованных мембран и создание синтетических СЭМ-изображений с ее помощью // Наноиндустрия.– 2026.– Том. 19. № 1.– с. 36–45. EDN: OAGPJO. Импакт-фактор 0,18 (РИНЦ), 0.5 печ.л., авторский вклад 1.

[A20] Bagrov D. V. Poly(hydroxybutyrate- co -hydroxyvalerate) and bovine serum albumin blend prepared by electrospinning / Pavlova E. R., Bagrov D. V., Kopitsyna M. N., Shchelokov D. A., Bonartsev A. P., Zharkova I. I., Mahina T. K., Myshkina V. L., Bonartseva G. A., Shaitan K. V., Klinov D. V. // Journal of Applied Polymer Science.– 2017.– Vol. 134. № 29.– P. 45090. EDN: YVCQJR. Импакт-фактор 3,1 (JIF), 0.5 печ.л., авторский вклад 0.35.

[A21] Bagrov D. The miscibility and spatial distribution of the components in electrospun polymer–protein mats / Pavlova E., Nikishin I., Bogdanova A., Klinov D., Bagrov D. // RSC Advances.– 2020.– Vol. 10. № 8.– pp. 4672–4680. EDN: SZZUCT. Импакт-фактор 6,1 (JIF), 0.5 печ.л., авторский вклад 0.3.

[A22] Bagrov D. V. Distribution of polylactide and gelatin in single electrospun nanofibers studied by Raman spectroscopy / Bagrov D. V., Nikishin I. I., Pavlova E. R., Klinov D. V. // AIP Conference Proceedings.– 2019.– Vol. 2064. No. 1.– P. 040001. EDN: EIWBTY. Импакт-фактор 0,146 (SJR), 0.25 печ.л., авторский вклад 0.7.

[A23] Bagrov D. V. Investigation of cellular morphology and proliferation on patterned electrospun PLA-gelatin mats / Bogdanova A. S., Sokolova A. I., Pavlova E. R.,

Klinov D. V., Bagrov D. V. // Journal of Biological Physics.– 2021.– Vol. 47.– pp. 205–214. EDN: SCDXPU. Импакт-фактор 2.0 (IF), 0.4 печ.л., авторский вклад 0.35.

[A24] Bagrov D. Acceleration of Electrospun PLA Degradation by Addition of Gelatin / Bogdanova A., Pavlova E., Polyanskaya A., Volkova M., Biryukova E., Filkov G., Trofimenko A., Durymanov M., Klinov D., Bagrov D. // International Journal of Molecular Sciences.– 2023.– Vol. 24. № 4.– EDN: HSJEKO. Импакт-фактор 5,6 (JIF), 0.7 печ.л., авторский вклад 0.15.

[A25] Багров Д. В. Деформация ядер кератиноцитов HaCaT на ориентированных волокнистых субстратах / Павлова Е. Р., Багров Д. В., Храмова Ю. В., Клинов Д. В., Шайтан К. В. // Вестник Московского Университета. Серия 16 Биология.– 2017.– Том. 72. № 2.– с. 99–105. EDN: YKORHH. Импакт-фактор 0,443 (РИНЦ), 0.3 печ.л., авторский вклад 0.4.

Bagrov D. V. Nuclei deformation in HaCaT keratinocytes cultivated on aligned fibrous substrates / Pavlova E. R., Bagrov D. V., Khramova Yu. V., Klinov D. V., Shaitan K. V. // Moscow University Biological Sciences Bulletin.– 2017.– Vol. 72. № 2.– pp. 85–90. EDN: XNFZIG. Импакт-фактор 0,161 (SJR), 0.3 печ.л., авторский вклад 0.4.

[A26] Bagrov D. V. Tuning the properties of electrospun polylactide mats by ethanol treatment / Pavlova E. R., Bagrov D. V., Monakhova K. Z., Piryazev A. A., Sokolova A. I., Ivanov D. A., Klinov D. V. // Materials and Design.– 2019.– Vol. 181.– P. 108061. EDN: YYWKGS. Импакт-фактор 8,2 (JIF), 0.4 печ.л., авторский вклад 0.4.

[A27] Bagrov D. V. Application of fluorescence and scanning electron microscopy for the investigation of cell contact guidance / Sokolova A. I., Pavlova E. R., Khramova Yu. V., Bagrov D. V., Klinov D. V., Shaitan K. V. // AIP Conference Proceedings.– 2019.– Vol. 2064. No.1.– P. 020004. EDN: JERCEW. Импакт-фактор 0,146 (SJR), 0.25 печ.л., авторский вклад 0.3.

[A28] Bagrov D. V. Imaging human keratinocytes grown on electrospun mats by scanning electron microscopy / Sokolova A. I., Pavlova E. R., Khramova Y. V., Klinov D. V., Shaitan K. V., Bagrov D. V. // Microscopy Research and Technique.– 2019.– Vol. 82. № 5.– pp. 544–549. EDN: UFXXOJ. Импакт-фактор 2,1 (JIF), 0.3 печ.л., авторский вклад 0.4.

[A29] Bagrov D. V. Convection-Diffusion-Adsorption Model for the Description of the Analyte-Binding Reactions on a Membrane / Prusakov K. A., Bagrov D. V. // Analytical Letters.– 2024.– Vol. 57. No. 16.– pp. 2745–2761. EDN: ZDRONM. Импакт-фактор 1,8 (JIF), 1 печ.л., авторский вклад 0.5.

[A30] Bagrov D. Pressure-Driven Sample Flow through an Electrospun Membrane Increases the Analyte Adsorption / Maslakova A., Prusakov K., Sidorova A., Pavlova E., Ramonova A., Bagrov D. // Micro.– 2023.– Vol. 3. № 2.– pp. 566–577. EDN: AWAPNA. Импакт-фактор 2,4 (JIF), 0.65 печ.л., авторский вклад 0.5.

[A31] Багров Д. В. Оригинальность без привилегий: сравнительный анализ электроформованных и стандартных нитроцеллюлозных мембран в иммуноанализе на мелатонин / Замалутдинова С. В., Петрова П. А., Рамонова А. А., Багров Д. В. // Наноиндустрия.– 2024.– Том. 17. № 3–4.– с. 220–229. EDN: TZOBCY. Импакт-фактор 0,18 (РИНЦ), 0.5 печ.л., авторский вклад 0.6.

[A32] Багров Д. В. Адсорбция белков на нитроцеллюлозные мембраны из потока раствора – теория и эксперимент / Прусаков К. А., Замалутдинова С. В., Сидорова А. Е., Багров Д. В. // Биофизика.– 2024.– Том. 69. № 5.– с. 949–958. EDN: MLOHZK. Импакт-фактор 0,593 (РИНЦ), 0.5 печ.л., авторский вклад 0.5.

Bagrov D. V. Adsorption of Proteins onto Nitrocellulose Membranes from a Flowing Solution – Theory and Experiment / Prusakov K. A., Zamalutdinova S. V., Sidorova A. E., Bagrov D. V. // Biophysics.– 2024.– Vol. 69. № 5.– pp. 820–827. EDN: PJOJNV. Импакт-фактор 0,197 (SJR), 0.5 печ.л., авторский вклад 0.5.

[A33] Bagrov D. Optical sensors based on electrospun membranes – principles, applications, and prospects for chemistry and biology / Pavlova E., Maslakova A., Prusakov K., Bagrov D. // New Journal of Chemistry.– 2022.– Vol. 46. № 18.– pp. 8356–8380. EDN: ZBYCLR. Импакт-фактор 2,6 (JIF), 1.4 печ.л., авторский вклад 0.25.

#### *Прочие публикации*

[A34] Багров Д. В. Ориентация волокон в матриксах из поли (ε–капролактона), желатина и их смеси, полученных методом электроспиннинга / Павлова Е. Р., Багров Д. В., Соколова А. И., Клинов Д. В. // Нанотехнологии: разработка, применение — XXI Век.– 2018.– Том. 1. № 10.– с. 20–26. EDN: XOZBGX. Импакт-фактор 0,191 (РИНЦ), 0.35 печ.л., авторский вклад 0.4.

## Список литературы

- [1] Кнунянц И. Л., *Химический энциклопедический словарь*. Москва: «Советская энциклопедия», 1982.
- [2] A. Aggeli *et al.*, «Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide  $\beta$ -sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 21, pp. 11857–11862, 2001, doi: 10.1073/pnas.191250198.
- [3] A. Barhoum, K. Pal, H. Rahier, H. Uludag, I. S. Kim, and M. Bechelany, «Nanofibers as new-generation materials: From spinning and nano-spinning fabrication techniques to emerging applications», *Appl. Mater. Today*, vol. 17, pp. 1–35, 2019, doi: 10.1016/j.apmt.2019.06.015.
- [4] L. Wei, H. Yu, L. Jia, and X. Qin, «High-throughput nanofiber produced by needleless electrospinning using a metal dish as the spinneret», *Text. Res. J.*, vol. 88, no. 1, pp. 80–88, 2018, doi: 10.1177/0040517516677232.
- [5] M. Pick, R. Lovell, and A. H. Windle, «X-ray measurement of chain orientation in non-crystalline polymers», *Polym. (United Kingdom)*, vol. 21, no. 9, pp. 1017–1024, 1980, doi: 10.1016/0032-3861(80)90031-2.
- [6] A. Peterlin, «Drawing and extrusion of semi-crystalline polymers», *Colloid Polym. Sci.*, vol. 265, no. 5, pp. 357–382, 1987, doi: 10.1007/BF01412215.
- [7] Y. Lu and Y. Men, «Cavitation-Induced Stress Whitening in Semi-Crystalline Polymers», *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 303, no. 11, pp. 1–31, 2018, doi: 10.1002/mame.201800203.
- [8] S. Xu, J. Zhou, and P. Pan, «Strain-induced multiscale structural evolutions of crystallized polymers: From fundamental studies to recent progresses», *Prog. Polym. Sci.*, vol. 140, p. 101676, 2023, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2023.101676.
- [9] А. С. Кечекьян, Л. М. Ярышева, П. А. Кечекьян, А. А. Долгова, «Деформационная фибриллизация стеклообразных полимеров», *Известия Академии наук. Серия химическая*, Том. 1, с. 1–22, 2018.
- [10] А. Л. Волынский, Н. Ф. Бакеев, *Структурная самоорганизация аморфных полимеров*. Москва: Физматлит, 2005.
- [11] S. Humbert, O. Lame, J. M. Chenal, C. Rochas, and G. Vigier, «New insight on initiation of cavitation in semicrystalline polymers: In-situ SAXS measurements», *Macromolecules*, vol. 43, no. 17, pp. 7212–7221, 2010, doi: 10.1021/ma101042d.
- [12] C. G'Sell, J. M. Hiver, and A. Dahoun, «Experimental characterization of deformation damage in solid polymers under tension, and its interrelation with necking», *Int. J. Solids*

- Struct.*, vol. 39, no. 13–14, pp. 3857–3872, 2002, doi: 10.1016/S0020-7683(02)00184-1.
- [13] A. Rozanski and A. Galeski, «Crystalline Lamellae Fragmentation during Drawing of Polypropylene», *Macromolecules*, vol. 48, no. 15, pp. 5310–5322, 2015, doi: 10.1021/acs.macromol.5b01180.
- [14] G. Matsuba, C. Ito, Y. Zhao, R. Inoue, K. Nishida, and T. Kanaya, «In situ small-angle X-ray and neutron scattering measurements on a blend of deuterated and hydrogenated polyethylenes during uniaxial drawing», *Polym. J.*, vol. 45, no. 3, pp. 293–299, 2013, doi: 10.1038/pj.2012.143.
- [15] Z. Bartczak and A. Vozniak, «WAXS/SAXS study of plastic deformation instabilities and lamellae fragmentation in polyethylene», *Polymer*, vol. 177, pp. 160–177, 2019, doi: 10.1016/j.polymer.2019.05.076.
- [16] F. Detrez, S. Cantournet, and R. Seguela, «Plasticity/damage coupling in semi-crystalline polymers prior to yielding: Micromechanisms and damage law identification», *Polymer*, vol. 52, no. 9, pp. 1998–2008, 2011, doi: 10.1016/j.polymer.2011.03.012.
- [17] C. Thomas, R. Seguela, F. Detrez, V. Miri, and C. Vanmansart, «Plastic deformation of spherulitic semi-crystalline polymers: An in situ AFM study of polybutene under tensile drawing», *Polymer*, vol. 50, no. 15, pp. 3714–3723, 2009, doi: 10.1016/j.polymer.2009.06.023.
- [18] S. Y. Lee, D. C. Bassett, and R. H. Olley, «Lamellar deformation and its variation in drawn isolated polyethylene spherulites», *Polymer*, vol. 44, no. 19, pp. 5961–5967, 2003, doi: 10.1016/S0032-3861(03)00545-7.
- [19] А. Л. Волинский, А. Ю. Ярышева, Е. Г. Рухля, А. В. Ефимов, Л. М. Ярышева, Н. Ф. Бакеев, «Деформационное размягчение стеклообразных и кристаллических полимеров», *Успехи Химии*, Том. 82, № 10, с. 988–1006, 2013.
- [20] Y. Li, Y. Gao, W. Hu, and Z. Lu, «Research Progress of Hard Elastic Fibers», *J. Fiber Sci. Technol.*, vol. 80, no. 12, pp. 237–251, 2024, doi: 10.2115/fiberst.2024-0024.
- [21] P. Bettotti, «Submicron Porous Materials», in *Submicron Porous Materials*, P. Bettotti, Ed., Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 1–346. doi: 10.1007/978-3-319-53035-2.
- [22] C. H. Du, B. K. Zhu, and Y. Y. Xu, «A study on the relationship between the crystal structure and hard elasticity of PVDF fibers», *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 290, no. 8, pp. 786–791, 2005, doi: 10.1002/mame.200400327.

- [23] R. T. Chen, C. K. Saw, M. G. Jamieson, T. R. Aversa, and R. W. Callahan, «Structural characterization of Celgard® microporous membrane precursors: Melt-extruded polyethylene films», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 53, no. 5, pp. 471–483, 1994, doi: 10.1002/app.1994.070530502.
- [24] J. Chen, Y. Yan, T. Sun, Y. Qi, and X. Li, «Deformation and fracture behaviors of microporous polymer separators for lithium ion batteries», *RSC Adv.*, vol. 4, no. 29, pp. 14904–14914, 2014, doi: 10.1039/c4ra00983e.
- [25] C. Lei, R. Xu, Z. Tian, H. Huang, J. Xie, and X. Zhu, «Stretching-Induced Uniform Micropores Formation: An in Situ SAXS/WAXS Study», *Macromolecules*, vol. 51, no. 9, pp. 3433–3442, 2018, doi: 10.1021/acs.macromol.7b02335.
- [26] S. Kreitmeier, M. Wittkop, T. Wagner, D. Göritz, and R. Zietz, «Investigations of hard elastic polypropylene with respect to the coil-strand-transition model», *Colloid Polym. Sci.*, vol. 273, no. 11, pp. 1008–1021, 1995, doi: 10.1007/BF00657667.
- [27] S. Kreitmeier and D. Göritz, «A new model of inhomogeneous deformation used for craze formation», *Makromol. Chemie. Macromol. Symp.*, vol. 41, no. 1, pp. 253–260, 1991, doi: 10.1002/masy.19910410121.
- [28] D. Göritz, S. Kreitmeier, and M. Wittkop, «Micromechanism of the deformation process of macromolecular systems», *J. Macromol. Sci. Part B*, vol. 35, no. 3–4, pp. 615–627, 1996, doi: 10.1080/00222349608220398.
- [29] C. M. Hansen, «On predicting environmental stress cracking in polymers», *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 77, no. 1, pp. 43–53, 2002, doi: 10.1016/S0141-3910(02)00078-2.
- [30] L. F. Al-Saidi, K. Mortensen, and K. Almdal, «Environmental stress cracking resistance. Behaviour of polycarbonate in different chemicals by determination of the time-dependence of stress at constant strains», *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 82, no. 3, pp. 451–461, 2003, doi: 10.1016/S0141-3910(03)00199-X.
- [31] Е. С. Трофимчук и др., «Крейзинг изотактического полипропилена в среде сверхкритического диоксида углерода», *Высокомолекулярные соединения. Серия А*, Том. 53, № 7, с. 1020–1032, 2011.
- [32] A. L. Volinskii and N. F. Bakeev, «Solvent Crazing and Mechanical Response of Polymer», in *Solvent Crazing of Polymers*, 1995, pp. 137–206. doi: 10.1016/B978-0-444-81848-5.50008-3.
- [33] K. Watanabe, B. Kim, Y. Enomoto, and I. Kim, «Fabrication of Uniaxially Aligned Poly(propylene) Nanofibers via Handspinning», *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 296, no. 6, pp. 568–573, 2011, doi: 10.1002/mame.201000408.

- [34] H. Lee, Y. Inoue, M. Kim, X. Ren, and I. S. Kim, «Effective Formation of Well-Defined Polymeric Microfibers and Nanofibers with Exceptional Uniformity by Simple Mechanical Needle Spinning», *Polymers (Basel)*., vol. 10, no. 9, p. 980, 2018, doi: 10.3390/polym10090980.
- [35] A. Tokarev *et al.*, «Touch- and Brush-Spinning of Nanofibers», *Adv. Mater.*, vol. 27, no. 41, pp. 6526–6532, 2015, doi: 10.1002/adma.201502768.
- [36] Edmond Research and Development, «Global Fiber Market Overview.», 2023
- [37] R. Hufenus, Y. Yan, M. Dauner, and T. Kikutani, «Melt-spun fibers for textile applications», *Materials (Basel)*., vol. 13, no. 19, pp. 1–32, 2020, doi: 10.3390/ma13194298.
- [38] S. Kase and T. Matsuo, «Studies on melt spinning. I. Fundamental equations on the dynamics of melt spinning», *J. Polym. Sci. Part A Gen. Pap.*, vol. 3, no. 7, pp. 2541–2554, 1965, doi: 10.1002/pol.1965.100030712.
- [39] K. Gzyra-Jagięła, K. Sulak, Z. Draczyński, S. Kęska, M. Puchalski, and L. Madej-Kiełbik, «Influence of Low-Molecular-Weight Esters on Melt Spinning and Structure of Poly(lactic acid) Fibers», *Materials (Basel)*., vol. 17, no. 6, p. 1268, 2024, doi: 10.3390/ma17061268.
- [40] L. Meng *et al.*, «Crystallization and Mechanical Properties of the Polylactide Melt Blown Nonwovens», *Fibers Polym.*, vol. 24, no. 9, pp. 3101–3114, 2023, doi: 10.1007/s12221-023-00294-6.
- [41] E. Tran *et al.*, «Hot-drawing ionic liquid-spun lignin–poly(vinyl alcohol) fibres increases strength and polymer alignment», *Faraday Discuss.*, 2026, doi: 10.1039/D5FD00099H.
- [42] I. Y. Skvortsov *et al.*, «Fiber Spinning of Polyacrylonitrile Terpolymers Containing Acrylic Acid and Alkyl Acrylates», *Fibers*, vol. 11, no. 7, p. 65, 2023, doi: 10.3390/fib11070065.
- [43] R. (Rongguo) Zhao, L. C. Wadsworth, C. Sun, and D. Zhang, «Properties of PP/PET bicomponent melt blown microfiber nonwovens after heat-treatment», *Polym. Int.*, vol. 52, no. 1, pp. 133–137, 2003, doi: 10.1002/pi.1070.
- [44] Y. Lee and L. C. Wadsworth, «Structure and filtration properties of melt blown polypropylene webs», *Polym. Eng. Sci.*, vol. 30, no. 22, pp. 1413–1419, 1990, doi: 10.1002/pen.760302202.
- [45] J. Drabek and M. Zatloukal, «Influence of long chain branching on fiber diameter distribution for polypropylene nonwovens produced by melt blown process», *J. Rheol.*

- (N. Y. N. Y.), vol. 63, no. 4, pp. 519–532, 2019, doi: 10.1122/1.5048585.
- [46] A. M. Bier, M. Redel, and D. W. Schubert, «Model to Predict Polymer Fibre Diameter during Melt Spinning», *Adv. Polym. Technol.*, vol. 2023, pp. 1–11, 2023, doi: 10.1155/2023/7983819.
  - [47] N. K. Zhiganov, V. I. Yankov, E. N. Alekseev, and A. V. Genis, «Effect of aerodynamic spinning parameters and polymer properties on fibre diameter», *Fibre Chem.*, vol. 20, no. 5, pp. 322–326, 1989, doi: 10.1007/BF00545399.
  - [48] C. J. Ellison, A. Phatak, D. W. Giles, C. W. Macosko, and F. S. Bates, «Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup», *Polymer*, vol. 48, no. 11, pp. 3306–3316, 2007, doi: 10.1016/j.polymer.2007.04.005.
  - [49] P.-G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, and D. Quéré, «Capillarity: Deformable Interfaces», in *Capillarity and Wetting Phenomena*, New York, NY: Springer New York, 2004, pp. 1–31. doi: 10.1007/978-0-387-21656-0\_1.
  - [50] P.-G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, and D. Quéré, «Hydrodynamics of Interfaces: Thin Films, Waves, and Ripples», in *Capillarity and Wetting Phenomena*, New York, NY: Springer New York, 2004, pp. 107–138. doi: 10.1007/978-0-387-21656-0\_5.
  - [51] J. Eggers and E. Villermaux, «Physics of liquid jets», *Reports Prog. Phys.*, vol. 71, no. 3, 2008, doi: 10.1088/0034-4885/71/3/036601.
  - [52] J. Eggers, «Nonlinear dynamics and breakup of free-surface flows», *Rev. Mod. Phys.*, vol. 69, no. 3, pp. 865–930, 1997, doi: 10.1103/RevModPhys.69.865.
  - [53] A. L. Huebner and H. N. Chu, «Instability and breakup of charged liquid jets», *J. Fluid Mech.*, vol. 49, no. 2, pp. 361–372, 1971, doi: 10.1017/S002211207100212X.
  - [54] D. K. Nathan and K. N. Prabhu, «Wettability of polyethylene terephthalate melt on steel substrates and the effect of cooling rate on polymer amorphicity», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 141, no. 42, 2024, doi: 10.1002/app.56097.
  - [55] M. Kruse, P. Wang, R. S. Shah, and M. H. Wagner, «Analysis of high melt-strength poly(ethylene terephthalate) produced by reactive processing by shear and elongational rheology», *Polym. Eng. Sci.*, vol. 59, no. 2, pp. 396–410, 2019, doi: 10.1002/pen.24936.
  - [56] S. Le Dizès and E. Villermaux, «Capillary jet breakup by noise amplification», *J. Fluid Mech.*, vol. 810, pp. 281–306, 2017, doi: 10.1017/jfm.2016.723.
  - [57] C. D. Han, R. R. Lamonte, and Y. T. Shah, «Studies on melt spinning. III. Flow instabilities in melt spinning: Melt fracture and draw resonance», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 16, no. 12, pp. 3307–3323, 1972, doi: 10.1002/app.1972.070161221.
  - [58] R. Nayak, «Results and Discussion: Meltblowing», in *Polypropylene Nanofibers Melt*

- Electrospinning Versus Meltblowing*, Ho Chi Minh City: Springer International Publishing, 2017, pp. 131–160. doi: 10.1007/978-3-319-61458-8\_8.
- [59] П. И. Басманов, В. Н. Кириченко, Ю. Н. Филатов, and Ю. Л. Юров, *Высокоэффективная очистка газов от аэрозолей фильтрами Петрянова*. Москва: Наука, 2002.
- [60] Ю. Н. Филатов, *Электроформование волокнистых материалов. (ЭФВ-процесс)*. Москва, 2001.
- [61] H. Lee and I. S. Kim, «Nanofibers: Emerging Progress on Fabrication Using Mechanical Force and Recent Applications», *Polym. Rev.*, vol. 58, no. 4, pp. 688–716, 2018, doi: 10.1080/15583724.2018.1495650.
- [62] C. J. Luo, S. D. Stoyanov, E. Stride, E. Pelan, and M. Edirisinghe, «Electrospinning versus fibre production methods: From specifics to technological convergence», 2012. doi: 10.1039/c2cs35083a.
- [63] M. N. Shuakat and T. Lin, «Recent Developments in Electrospinning of Nanofiber Yarns», *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 14, no. 2, pp. 1389–1408, 2014, doi: 10.1166/jnn.2014.9197.
- [64] G. S. Hussey, J. L. Dziki, and S. F. Badylak, «Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine», *Nat. Rev. Mater.*, vol. 3, no. 7, pp. 159–173, 2018, doi: 10.1038/s41578-018-0023-x.
- [65] S. Gao, Z. Yuan, T. Xi, X. Wei, and Q. Guo, «Characterization of decellularized scaffold derived from porcine meniscus for tissue engineering applications», *Front. Mater. Sci.*, vol. 10, no. 2, pp. 101–112, 2016, doi: 10.1007/s11706-016-0335-y.
- [66] S. L. Voytik-Harbin, A. O. Brightman, B. Z. Waisner, J. P. Robinson, and C. H. Lamar, «Small Intestinal Submucosa: A Tissue-Derived Extracellular Matrix That Promotes Tissue-Specific Growth and Differentiation of Cells in Vitro», *Tissue Eng.*, vol. 4, no. 2, pp. 157–174, 1998, doi: 10.1089/ten.1998.4.157.
- [67] R. Kessick, J. Fenn, and G. Tepper, «The use of AC potentials in electrospraying and electrospinning processes», *Polymer*, vol. 45, no. 9, pp. 2981–2984, 2004, doi: 10.1016/j.polymer.2004.02.056.
- [68] D. P. Ura *et al.*, «The role of electrical polarity in electrospinning and on the mechanical and structural properties of as-spun fibers», *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 18, 2020, doi: 10.3390/ma13184169.
- [69] D. P. Ura and U. Stachewicz, «The Significance of Electrical Polarity in Electrospinning: A Nanoscale Approach for the Enhancement of the Polymer Fibers’

- Properties», *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 307, no. 5, pp. 1–23, 2022, doi: 10.1002/mame.202100843.
- [70] M. M. Hohman, M. Shin, G. Rutledge, and M. P. Brenner, «Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications», *Phys. Fluids*, vol. 13, no. 8, pp. 2221–2236, 2001, doi: 10.1063/1.1384013.
- [71] S. V. Fridrikh, J. H. Yu, M. P. Brenner, and G. C. Rutledge, «Controlling the Fiber Diameter during Electrospinning», *Phys. Rev. Lett.*, vol. 90, no. 14, p. 144502, 2003, doi: 10.1103/PhysRevLett.90.144502.
- [72] D. H. Reneker and A. L. Yarin, «Electrospinning jets and polymer nanofibers», *Polymer*, vol. 49, no. 10, pp. 2387–2425, 2008, doi: 10.1016/j.polymer.2008.02.002.
- [73] P. Martin and E. Zussman, «Charge transport in electrospinning of polyelectrolyte solutions», *Soft Matter*, vol. 20, no. 28, pp. 5572–5582, 2024, doi: 10.1039/d4sm00605d.
- [74] L. Wang, C. Pai, M. C. Boyce, and G. C. Rutledge, «Wrinkled surface topographies of electrospun polymer fibers», *Appl. Phys. Lett.*, vol. 94, no. 15, p. 151916, 2009, doi: 10.1063/1.3118526.
- [75] M. S. Wilm and M. Mann, «Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole’s beam of macromolecules at last?», *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 136, no. 2–3, pp. 167–180, 1994, doi: 10.1016/0168-1176(94)04024-9.
- [76] G. I. Taylor, «Disintegration of water drops in an electric field», *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.*, vol. 280, no. 1382, pp. 383–397, 1964, doi: 10.1098/rspa.1964.0151.
- [77] P. K. Baumgarten, «Electrostatic spinning of acrylic microfibers», *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 36, no. 1, pp. 71–79, 1971, doi: 10.1016/0021-9797(71)90241-4.
- [78] V. N. Morozov and T. Y. Morozova, «Electrospray Deposition as a Method To Fabricate Functionally Active Protein Films», *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 7, pp. 1415–1420, 1999, doi: 10.1021/ac9808775.
- [79] W. Zuo, M. Zhu, W. Yang, H. Yu, Y. Chen, and Y. Zhang, «Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning», *Polym. Eng. Sci.*, vol. 45, no. 5, pp. 704–709, 2005, doi: 10.1002/pen.20304.
- [80] H. Zhao and H. Chi, «Electrospun Bead-on-String Fibers: Useless or Something of Value?», in *Novel Aspects of Nanofibers*, InTech, 2018. doi: 10.5772/intechopen.74661.
- [81] C. Zhang, X. Yuan, L. Wu, Y. Han, and J. Sheng, «Study on morphology of electrospun

- poly(vinyl alcohol) mats», *Eur. Polym. J.*, vol. 41, no. 3, pp. 423–432, 2005, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2004.10.027.
- [82] S. L. Shenoy, W. D. Bates, H. L. Frisch, and G. E. Wnek, «Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer–polymer interaction limit», *Polymer*, vol. 46, no. 10, pp. 3372–3384, 2005, doi: 10.1016/j.polymer.2005.03.011.
- [83] M. Rajeev and C. C. Helms, «A Study of the Relationship between Polymer Solution Entanglement and Electrospun PCL Fiber Mechanics», *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 23, 2023, doi: 10.3390/polym15234555.
- [84] C. Wang, Y. Wang, and T. Hashimoto, «Impact of Entanglement Density on Solution Electrospinning: A Phenomenological Model for Fiber Diameter», *Macromolecules*, vol. 49, no. 20, pp. 7985–7996, 2016, doi: 10.1021/acs.macromol.6b00519.
- [85] А. А. Ольхов, «Гетерогенные матрично-фибриллярные материалы на основе полигидроксibuтирата: структура, функции, применение», диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук, 2023.
- [86] D. H. Reneker, A. L. Yarin, H. Fong, and S. Koombhongse, «Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning», *J. Appl. Phys.*, vol. 87, no. 9, pp. 4531–4547, 2000, doi: 10.1063/1.373532.
- [87] J. J. Yu *et al.*, «Production of aligned helical polymer nanofibers by electrospinning», *Eur. Polym. J.*, vol. 44, no. 9, pp. 2838–2844, 2008, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2008.05.020.
- [88] D. W. Schubert, «Revealing Novel Power Laws and Quantization in Electrospinning Considering Jet Splitting—Toward Predicting Fiber Diameter and Its Distribution», *Macromol. Theory Simulations*, vol. 28, no. 4, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1002/mats.201900006.
- [89] D. W. Schubert, V. Allen, and U. Dippel, «Revealing Novel Power Laws and Quantization in Electrospinning Considering Jet Splitting—Toward Predicting Fiber Diameter and Its Distribution Part II Experimental», *Adv. Eng. Mater.*, vol. 23, no. 3, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1002/adem.202001161.
- [90] C. L. Pai, M. C. Boyce, and G. C. Rutledge, «Morphology of porous and wrinkled fibers of polystyrene electrospun from dimethylformamide», *Macromolecules*, vol. 42, no. 6, pp. 2102–2114, 2009, doi: 10.1021/ma802529h.
- [91] S. Koombhongse, W. Liu, and D. H. Reneker, «Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning», *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 39, no. 21, pp. 2598–2606,

- 2001, doi: 10.1002/polb.10015.
- [92] M. Richard-Lacroix and C. Pellerin, «Molecular Orientation in Electrospun Fibers: From Mats to Single Fibers», *Macromolecules*, vol. 46, no. 24, pp. 9473–9493, 2013, doi: 10.1021/ma401681m.
  - [93] J. Moohan *et al.*, «Cellulose Nanofibers and Other Biopolymers for Biomedical Applications. A Review», *Appl. Sci.*, vol. 10, no. 1, p. 65, 2019, doi: 10.3390/app10010065.
  - [94] S. Mi, B. Chen, B. Wright, and C. J. Connon, «Plastic compression of a collagen gel forms a much improved scaffold for ocular surface tissue engineering over conventional collagen gels», *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 95A, no. 2, pp. 447–453, 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32861.
  - [95] R. Nelson and D. Eisenberg, «Structural Models of Amyloid-Like Fibrils», in *Fibrous Proteins: Amyloids, Prions and Beta Proteins*, vol. Volume 73, J. M. S. and D. A. D. P. B. T.-A. in P. C. Andrey Kajava, Ed., Academic Press, 2006, pp. 235–282. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233\(06\)73008-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233(06)73008-X).
  - [96] W. Pulawski, U. Ghoshdastider, V. Andrisano, and S. Filipek, «Ubiquitous amyloids.», *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 166, no. 7, pp. 1626–43, 2012, doi: 10.1007/s12010-012-9549-3.
  - [97] N. M. Kad, S. L. Myers, D. P. Smith, D. A. Smith, S. E. Radford, and N. H. Thomson, «Hierarchical assembly of beta2-microglobulin amyloid in vitro revealed by atomic force microscopy.», *J. Mol. Biol.*, vol. 330, no. 4, pp. 785–797, 2003, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00583-7.
  - [98] J. Adamcik and R. Mezzenga, «Proteins Fibrils from a Polymer Physics Perspective», *Macromolecules*, vol. 45, no. 3, pp. 1137–1150, 2012, doi: 10.1021/ma202157h.
  - [99] T. Sugiyama *et al.*, «Quick Shear-Flow Alignment of Biological Filaments for X-ray Fiber Diffraction Facilitated by Methylcellulose», *Biophys. J.*, vol. 97, no. 12, pp. 3132–3138, 2009, doi: 10.1016/j.bpj.2009.09.041.
  - [100] M. Groenning, «Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status», *J. Chem. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–18, 2010, doi: 10.1007/s12154-009-0027-5.
  - [101] W. E. Klunk, J. W. Pettegrew, and D. J. Abraham, «Quantitative evaluation of Congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation», *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 37, no. 8, pp. 1273–1281, 1989, doi: 10.1177/37.8.2666510.
  - [102] J. N. Buxbaum and R. P. Linke, «A Molecular History of the Amyloidoses», *J. Mol.*

- Biol.*, vol. 421, no. 2–3, pp. 142–159, 2012, doi: 10.1016/j.jmb.2012.01.024.
- [103] H. LeVine, «Quantification of  $\beta$ -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T», in *Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates*, vol. Volume 309, R. W. B. T.-M. in Enzymology, Ed., Academic Press, 1999, pp. 274–284. doi: 10.1016/S0076-6879(99)09020-5.
- [104] M. Ilanchelian and R. Ramaraj, «Emission of thioflavin T and its control in the presence of DNA», *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 162, no. 1, pp. 129–137, 2004, doi: 10.1016/S1010-6030(03)00320-4.
- [105] Z. Ye *et al.*, «Temperature and pH effects on biophysical and morphological properties of self-assembling peptide RADA16-I.», *J. Pept. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 152–62, 2008, doi: 10.1002/psc.988.
- [106] P. Arosio, M. Owczarz, H. Wu, A. Butté, and M. Morbidelli, «End-to-end self-assembly of RADA 16-I nanofibrils in aqueous solutions.», *Biophys. J.*, vol. 102, no. 7, pp. 1617–26, 2012, doi: 10.1016/j.bpj.2012.03.012.
- [107] A. R. Cormier, X. Pang, M. I. Zimmerman, H. X. Zhou, and A. K. Paravastu, «Molecular Structure of RADA16-I Designer Self-Assembling Peptide Nanofibers», *ACS Nano*, vol. 7, no. 9, pp. 7562–7572, 2013, doi: 10.1021/nn401562f.
- [108] R. Yang, J. Chen, D. Wang, Y. Xu, and G. Ou, «Self-Assembling Peptide RADA16 Nanofiber Scaffold Hydrogel-Wrapped Concentrated Growth Factors in Osteogenesis of MC3T3», *J. Funct. Biomater.*, vol. 14, no. 5, p. 260, 2023, doi: 10.3390/jfb14050260.
- [109] X. Yao *et al.*, «Self-Assembling Peptide RADA16: A Promising Scaffold for Tissue Engineering and Regenerative Medicine», *Nanomedicine*, vol. 18, no. 19, pp. 1305–1326, 2023, doi: 10.2217/nnm-2023-0161.
- [110] B. Ma and R. Nussinov, «Selective Molecular Recognition in Amyloid Growth and Transmission and Cross-Species Barriers», *J. Mol. Biol.*, vol. 421, no. 2–3, pp. 172–184, 2012, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.11.023>.
- [111] A. Perczel, P. Hudáky, and V. K. Pálfi, «Dead-End Street of Protein Folding: Thermodynamic Rationale of Amyloid Fibril Formation», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 48, pp. 14959–14965, 2007, doi: 10.1021/ja0747122.
- [112] C. F. Wright, S. A. Teichmann, J. Clarke, and C. M. Dobson, «The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins», *Nature*, vol. 438, no. 7069, pp. 878–881, 2005, doi: 10.1038/nature04195.
- [113] J. S. Richardson and D. C. Richardson, «Natural  $\beta$ -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 5, pp. 2754–2759,

- 2002, doi: 10.1073/pnas.052706099.
- [114] S. Jun, Y. Hong, H. Imamura, B. Y. Ha, J. Bechhoefer, and P. Chen, «Self-assembly of the ionic peptide EAK16: The effect of charge distributions on self-assembly», *Biophys. J.*, vol. 87, no. 2, pp. 1249–1259, 2004, doi: 10.1529/biophysj.103.038166.
  - [115] N. A. Chartrain, C. B. Williams, and A. R. Whittington, «A review on fabricating tissue scaffolds using vat photopolymerization», *Acta Biomater.*, vol. 74, pp. 90–111, 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.05.010.
  - [116] W. Fang *et al.*, «Light-based 3D bioprinting technology applied to repair and regeneration of different tissues: A rational proposal for biomedical applications», *Mater. Today Bio*, vol. 27, p. 101135, 2024, doi: 10.1016/j.mtbio.2024.101135.
  - [117] K. S. Lee, R. H. Kim, D. Y. Yang, and S. H. Park, «Advances in 3D nano/microfabrication using two-photon initiated polymerization», *Prog. Polym. Sci.*, vol. 33, no. 6, pp. 631–681, 2008, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2008.01.001.
  - [118] J. Amirian, J. K. Wychowaniec, E. Amel Zendehdel, G. Sharma, A. Brangule, and D. Bandere, «Versatile Potential of Photo-Cross-Linkable Silk Fibroin: Roadmap from Chemical Processing Toward Regenerative Medicine and Biofabrication Applications», *Biomacromolecules*, vol. 24, no. 7, pp. 2957–2981, 2023, doi: 10.1021/acs.biomac.3c00098.
  - [119] K. S. Lim, M. H. Alves, L. A. Poole-Warren, and P. J. Martens, «Covalent incorporation of non-chemically modified gelatin into degradable PVA-tyramine hydrogels», *Biomaterials*, vol. 34, no. 29, pp. 7097–7105, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.06.005.
  - [120] S. Sakai, H. Ohi, T. Hotta, H. Kamei, and M. Taya, «Differentiation potential of human adipose stem cells bioprinted with hyaluronic acid/gelatin-based bioink through microextrusion and visible light-initiated crosslinking», *Biopolymers*, vol. 109, no. 2, 2018, doi: 10.1002/bip.23080.
  - [121] G. S. He, «Multi-Photon Excitation Based Nonlinear Optical Effects and Applications», in *Progress in Optics*, Elsevier, 2019, pp. 155–278. doi: 10.1016/bs.po.2019.01.001.
  - [122] В. И. Бредихин, М. Д. Галанин, and В. Н. Генкин, «Двухфотонное поглощение и спектроскопия», *Успехи физических наук*, Том. 110, № 1, с. 3–43, 1993.
  - [123] M. Rothhammer, D. T. Meiers, M. Maier, G. von Freymann, and C. Zollfrank, «Initiator-free photo-cross-linkable cellulose-based resists for fabricating submicron patterns via direct laser writing», *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 40, no. 4, p. 849, 2023, doi: 10.1364/JOSAB.479654.

- [124] Z.-C. Ma *et al.*, «Femtosecond laser programmed artificial musculoskeletal systems», *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 4536, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18117-0.
- [125] P. Guo, J. Huang, Y. Zhao, C. R. Martin, R. N. Zare, and M. A. Moses, «Nanomaterial Preparation by Extrusion through Nanoporous Membranes», *Small*, vol. 14, no. 18, pp. 1–16, 2018, doi: 10.1002/sml.201703493.
- [126] C. R. Martin, «Nanomaterials: A membrane-based synthetic approach», *Science*, vol. 266, no. 5193, pp. 1961–1966, 1994, doi: 10.1126/science.266.5193.1961.
- [127] S. L. Tao and T. A. Desai, «Aligned arrays of biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanowires and nanofibers by template synthesis», *Nano Lett.*, vol. 7, no. 6, pp. 1463–1468, 2007, doi: 10.1021/nl0700346.
- [128] А. А. Елисеев *и др.*, «Морфологическая модификация поверхности полимеров репликацией структуры анодного оксида алюминия», *Письма в ЖЭТФ*, Том. 92, № 7, с. 499–503, 2010.
- [129] V. M. Cepak and C. R. Martin, «Preparation of Polymeric Micro- and Nanostructures Using a Template-Based Deposition Method», *Chem. Mater.*, vol. 11, no. 5, pp. 1363–1367, 1999, doi: 10.1021/cm9811500.
- [130] S. L. Bechara, A. Judson, and K. C. Popat, «Template synthesized poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanowire surfaces for neural tissue engineering», *Biomaterials*, vol. 31, no. 13, pp. 3492–3501, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.084.
- [131] J. Martín, J. Maiz, J. Sacristan, and C. Mijangos, «Tailored polymer-based nanorods and nanotubes by ‘template synthesis’: From preparation to applications», *Polymer*, vol. 53, no. 6, pp. 1149–1166, 2012, doi: 10.1016/j.polymer.2012.01.028.
- [132] P. Sofokleous, M. H. W. Chin, and R. Day, *Phase-separation technologies for 3D scaffold engineering*. Elsevier Ltd, 2018. doi: 10.1016/B978-0-08-100979-6.00005-7.
- [133] A. V. G. Ruzette and A. M. Mayes, «A simple free energy model for weakly interacting polymer blends», *Macromolecules*, vol. 34, no. 6, pp. 1894–1907, 2001.
- [134] D. R. Lloyd, S. S. Kim, and K. E. Kinzer, «Microporous membrane formation via thermally-induced phase separation. II. Liquid-liquid phase separation», *J. Memb. Sci.*, vol. 64, no. 1–2, pp. 1–11, 1991, doi: 10.1016/0376-7388(91)80073-F.
- [135] R. Zeinali, L. J. Del Valle, J. Torras, and J. Puiggalí, «Recent progress on biodegradable tissue engineering scaffolds prepared by thermally-induced phase separation (Tips)», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 7, 2021, doi: 10.3390/ijms22073504.
- [136] P. X. Ma and R. Zhang, «Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 46, no. 1, pp. 60–72, 1999.

- [137] M. H. Syed, M. M. R. Khan, M. A. K. M. Zahari, M. D. H. Beg, and N. Abdullah, «A review on current trends and future perspectives of electrospun biopolymeric nanofibers for biomedical applications», *Eur. Polym. J.*, vol. 197, p. 112352, 2023, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2023.112352.
- [138] A. Hiwrale, S. Bharati, P. Pingale, and A. Rajput, «Nanofibers: A current era in drug delivery system», *Heliyon*, vol. 9, no. 9, p. e18917, 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18917.
- [139] J. B. Costa, H. Pereira, J. Espregueira-Mendes, G. Khang, J. M. Oliveira, and R. L. Reis, «Tissue engineering in orthopaedic sports medicine: current concepts», *J. ISAKOS*, vol. 2, no. 2, pp. 60–66, Mar. 2017, doi: 10.1136/jisakos-2016-000080.
- [140] A. Arjunan, A. Baroutaji, J. Robinson, and C. Wang, «Tissue Engineering Concept», in *Encyclopedia of Smart Materials*, Elsevier, 2022, pp. 103–112. doi: 10.1016/B978-0-12-815732-9.00120-0.
- [141] J. Cerneckis, H. Cai, and Y. Shi, «Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications», *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 9, no. 1, p. 112, 2024, doi: 10.1038/s41392-024-01809-0.
- [142] S. E. Navone *et al.*, «Decellularized silk fibroin scaffold primed with adipose mesenchymal stromal cells improves wound healing in diabetic mice», *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 5, no. 1, p. 7, 2014, doi: 10.1186/scrt396.
- [143] S. Kim, E. M. Kim, M. Yamamoto, H. Park, and H. Shin, «Engineering Multi-Cellular Spheroids for Tissue Engineering and Regenerative Medicine», *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 9, no. 23, 2020, doi: 10.1002/adhm.202000608.
- [144] S. Wang, Y. Zhang, H. Wang, G. Yin, and Z. Dong, «Fabrication and properties of the electrospun polylactide/silk fibroin-gelatin composite tubular scaffold», *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 8, pp. 2240–2244, 2009, doi: 10.1021/bm900416b.
- [145] J. Xue *et al.*, «Engineering ear-shaped cartilage using electrospun fibrous membranes of gelatin/polycaprolactone», *Biomaterials*, vol. 34, no. 11, pp. 2624–2631, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.011.
- [146] T. Desmet, R. Morent, N. De Geyter, C. Leys, E. Schacht, and P. Dubruel, «Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: A review», *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 9, pp. 2351–2378, 2009, doi: 10.1021/bm900186s.
- [147] R. Morent, N. De Geyter, T. Desmet, P. Dubruel, and C. Leys, «Plasma surface modification of biodegradable polymers: A review», Mar. 2011, *John Wiley & Sons*,

Ltd. doi: 10.1002/ppap.201000153.

- [148] M. Mahmoudifard, M. Soleimani, and M. Vossoughi, «Ammonia plasma-treated electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membrane: The robust substrate for protein immobilization through glutaraldehyde coupling chemistry for biosensor application», *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–14, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10040-7.
- [149] Y. Il Yoon, H. S. Moon, W. S. Lyoo, T. S. Lee, and W. H. Park, «Superhydrophobicity of PHBV fibrous surface with bead-on-string structure», *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 320, no. 1, pp. 91–95, 2008, doi: 10.1016/j.jcis.2008.01.029.
- [150] O. V Morozova *et al.*, «Surface modification with polyallylamines for adhesion of biopolymers and cells», *Int. J. Adhes. Adhes.*, vol. 92, no. March, pp. 125–132, 2019, doi: 10.1016/j.ijadhadh.2019.03.013.
- [151] F. Ma, L. He, E. Lindner, and D. Y. Wu, «Highly porous poly(L-lactic) acid nanofibers as a dual-signal paper-based bioassay platform for in vitro diagnostics», *Appl. Surf. Sci.*, vol. 542, 2020, pp. 21–23, 2021, doi: 10.1016/j.apsusc.2020.148732.
- [152] S. Sadir, M. P. Prabhakaran, D. H. B. Wicaksono, and S. Ramakrishna, «Fiber based enzyme-linked immunosorbent assay for C-reactive protein», *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 205, pp. 50–60, 2014, doi: 10.1016/j.snb.2014.08.051.
- [153] Z. Wang, W. Hu, W. Wang, Y. Xiao, Y. Chen, and X. Wang, «Antibacterial Electrospun Nanofibrous Materials for Wound Healing», *Adv. Fiber Mater.*, vol. 5, no. 1, pp. 107–129, 2023, doi: 10.1007/s42765-022-00223-x.
- [154] Y. H. Hsu, C.-T. Lin, Y.-H. Yu, Y.-C. Chou, S.-J. Liu, and E.-C. Chan, «Dual delivery of active antibactericidal agents and bone morphogenetic protein at sustainable high concentrations using biodegradable sheath-core-structured drug-eluting nanofibers», *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 11, pp. 3927–3937, 2016, doi: 10.2147/IJN.S107250.
- [155] H. Zigdon-Giladi, A. Khutaba, R. Elimelech, E. E. Machtei, and S. Srouji, «VEGF release from a polymeric nanofiber scaffold for improved angiogenesis», *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 105, no. 10, pp. 2712–2721, 2017, doi: 10.1002/jbm.a.36127.
- [156] Z. X. Meng, W. Zheng, L. Li, and Y. F. Zheng, «Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold», *Mater. Chem. Phys.*, vol. 125, no. 3, pp. 606–611, 2011, doi: 10.1016/j.matchemphys.2010.10.010.
- [157] D. I. Zeugolis *et al.*, «Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - Just an expensive way to make gelatin?», *Biomaterials*, vol. 29, no. 15, pp. 2293–2305, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.02.009.

- [158] M. N. Gupta, R. Batra, R. Tyagi, and A. Sharma, «Polarity index: The guiding solvent parameter for enzyme stability in aqueous-organic cosolvent mixtures», *Biotechnol. Prog.*, vol. 13, no. 3, pp. 284–288, 1997, doi: 10.1021/bp9700263.
- [159] C. N. Pace, S. Trevino, E. Prabhakaran, and J. M. Scholtz, «Protein structure, stability and solubility in water and other solvents», *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B-Biological Sci.*, vol. 359, no. 1448, pp. 1225–1234, 2004, doi: 10.1098/rstb.2004.1500.
- [160] S. Miyazawa and R. L. Jernigan, «Most probable intermediates in protein folding-unfolding with a noninteracting globule-coil model», *Biochemistry*, vol. 21, no. 21, pp. 5203–5213, 1982, doi: 10.1021/bi00264a015.
- [161] D. O. V. Alonso and K. A. Dill, «Solvent denaturation and stabilization of globular proteins», *Biochemistry*, vol. 30, no. 24, pp. 5974–5985, 1991, doi: 10.1021/bi00238a023.
- [162] Y. L. Khmelnitsky, V. V. Mozhaev, A. B. Belova, M. V. Sergeeva, and K. Martinek, «Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis», *Eur. J. Biochem.*, vol. 198, no. 1, pp. 31–41, 1991, doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb15983.x.
- [163] J. Rodakiewicz-Nowak, S. M. Kasture, B. Dudek, and J. Haber, «Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases», *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, 2000, doi: 10.1016/S1381-1177(00)00183-1.
- [164] F. D'Acunzo, A. M. Barreca, and C. Galli, «Determination of the activity of laccase, and mediated oxidation of a lignin model compound, in aqueous-organic mixed solvents», *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 31, no. 1–3, pp. 25–30, 2004, doi: 10.1016/j.molcatb.2004.07.001.
- [165] A. Banerjee, K. Chatterjee, and G. Madras, «Lipase mediated enzymatic degradation of polydioxanone in solution», *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 110, pp. 284–289, 2014, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.09.015.
- [166] R. Plothe *et al.*, «Poly(2-ethyloxazoline) as matrix for highly active electrospun enzymes in organic solvents.», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 114, no. 1, pp. 39–45, 2017, doi: 10.1002/bit.26043.
- [167] Е. Р. Павлова, «Изучение матриксов из полиэфира и белка, полученных методом электроспиннинга», диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, 2021.
- [168] S. Fleischer, A. Shapira, O. Regev, N. Nseir, E. Zussman, and T. Dvir, «Albumin fiber scaffolds for engineering functional cardiac tissues», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 111, no.

- 6, pp. 1246–1257, 2014, doi: 10.1002/bit.25185.
- [169] N. Amariei, L. R. Manea, A. P. Bertea, R. Cramariuc, A. Bertea, and O. Cramariuc, «Electrospinning Polyaniline for Sensors», *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 209, p. 012091, 2017, doi: 10.1088/1757-899X/209/1/012091.
- [170] N. Nikmaram *et al.*, «Emulsion-based systems for fabrication of electrospun nanofibers: food, pharmaceutical and biomedical applications», *RSC Adv.*, vol. 7, no. 46, pp. 28951–28964, 2017, doi: 10.1039/C7RA00179G.
- [171] S. Zhang, A. Garcia-D’Angeli, J. P. Brennan, and Q. Huo, «Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general», *Analyst*, vol. 139, no. 2, pp. 439–445, 2013, doi: 10.1039/c3an01835k.
- [172] B. B. Kim, E. B. Dikova, U. Sheller, M. M. Dikov, E. M. Gavrilova, and A. M. Egorov, «Evaluation of dissociation constants of antigen-antibody complexes by ELISA», *J. Immunol. Methods*, vol. 131, no. 2, pp. 213–222, 1990, doi: 10.1016/0022-1759(90)90192-X.
- [173] J. D. Bishop, H. V Hsieh, D. J. Gasperino, and B. H. Weigl, «Sensitivity enhancement in lateral flow assays: A systems perspective», 2019. doi: 10.1039/c9lc00104b.
- [174] M. Sajid, A. N. Kawde, and M. Daud, «Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review», *J. Saudi Chem. Soc.*, vol. 19, no. 6, pp. 689–705, 2015, doi: 10.1016/j.jscs.2014.09.001.
- [175] M. A. Mansfield, «The Use of Nitrocellulose Membranes in Lateral-Flow Assays», in *Drugs of Abuse*, no. 1, Totowa, NJ: Humana Press, 2007, pp. 71–85. doi: 10.1007/978-1-59259-951-6\_4.
- [176] J. L. Tonkinson, «Nitrocellulose a tried and true polymer finds utility as a post-genomic substrate», *Front. Biosci.*, vol. 7, no. 3, p. A755, 2002, doi: 10.2741/A755.
- [177] M. A. Mansfield, «Nitrocellulose Membranes for Lateral Flow Immunoassays: A Technical Treatise», in *Lateral Flow Immunoassay*, vol. 57, no. 3, Totowa, NJ: Humana Press, 2009, pp. 1–19. doi: 10.1007/978-1-59745-240-3\_6.
- [178] C. H. T. Yew, P. Azari, J. R. Choi, F. Li, and B. Pingguan-Murphy, «Electrospin-coating of nitrocellulose membrane enhances sensitivity in nucleic acid-based lateral flow assay», *Anal. Chim. Acta*, vol. 1009, pp. 81–88, 2018, doi: 10.1016/j.aca.2018.01.016.
- [179] C. Yew, P. Azari, J. Choi, F. Muhamad, and B. Pingguan-Murphy, «Electrospun Polycaprolactone Nanofibers as a Reaction Membrane for Lateral Flow Assay», *Polymers (Basel)*, vol. 10, no. 12, p. 1387, 2018, doi: 10.3390/polym10121387.
- [180] T. Kongklang, M. Kotaki, Y. Kousaka, T. Umemura, D. Nakaya, and S. Chirachanchai,

- «Electrospun Polyoxymethylene: Spinning Conditions and Its Consequent Nanoporous Nanofiber», *Macromolecules*, vol. 41, no. 13, pp. 4746–4752, 2008, doi: 10.1021/ma800731r.
- [181] H. Fashandi and M. Karimi, «Characterization of porosity of polystyrene fibers electrospun at humid atmosphere», *Thermochim. Acta*, vol. 547, pp. 38–46, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.tca.2012.08.003.
- [182] B. Gürel-Gökmen, H. D. Taslak, O. Özcan, N. İpar, and T. Tunali-Akbay, «Polycaprolactone/silk fibroin electrospun nanofibers-based lateral flow test strip for quick and facile determination of bisphenol A in breast milk», *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 2020, pp. 1–10, 2021, doi: 10.1002/jbm.b.34805.
- [183] J. S. Hersey, A. Meller, and M. W. Grinstaff, «Functionalized Nanofiber Meshes Enhance Immunosorbent Assays», *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 23, pp. 11863–11870, 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b03386.
- [184] S. Chantasirichot and K. Ishihara, «Electrospun phospholipid polymer substrate for enhanced performance in immunoassay system», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 38, no. 1, pp. 209–214, 2012, doi: 10.1016/j.bios.2012.05.029.
- [185] Q. Shi, X. Chen, T. Lu, and X. Jing, «The immobilization of proteins on biodegradable polymer fibers via click chemistry», *Biomaterials*, vol. 29, no. 8, pp. 1118–1126, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.11.008.
- [186] D. Yang *et al.*, «Electrospun Nanofibrous Membranes: A Novel Solid Substrate for Microfluidic Immunoassays for HIV», *Adv. Mater.*, vol. 20, no. 24, pp. 4770–4775, 2008, doi: 10.1002/adma.200801302.
- [187] H. J. Lee, H. S. Kim, H. O. Kim, and W. G. Koh, «Micropatterns of double-layered nanofiber scaffolds with dual functions of cell patterning and metabolite detection», *Lab Chip*, vol. 11, no. 17, pp. 2849–2857, 2011, doi: 10.1039/c1lc20186g.
- [188] J. Wang *et al.*, «Simple patterned nanofiber scaffolds and its enhanced performance in immunoassay», *PLoS One*, vol. 8, no. 12, pp. 1–8, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0082888.
- [189] C. F. O. Hoy, K. Kushiro, and M. Takai, «Fabrication and assessment of an electrospun polymeric microfiber-based platform under bulk flow conditions with rapid and efficient antigen capture», *Analyst*, vol. 143, no. 4, pp. 865–873, 2018, doi: 10.1039/c7an01366c.
- [190] M. Takai, C. F. O. Hoy, and A. Yoshihara, «Electrospun polymeric microfiber substrates for rapid protein and cell-based assays», *J. Photopolym. Sci. Technol.*, vol. 31, no. 1, pp. 65–69, 2018, doi: 10.2494/photopolymer.31.65.

- [191] A. Aramvash and M. S. Seyedkarimi, «All-Atom Molecular Dynamics Study of Four RADA 16-I Peptides: The Effects of Salts on Cluster Formation», *J. Clust. Sci.*, 2015, doi: 10.1007/s10876-014-0836-8.
- [192] E. A. Obraztsova, D. V. Basmanov, N. A. Barinov, and D. V. Klinov, «Carbon Nanospikes: Synthesis, characterization and application for high resolution AFM», *Ultramicroscopy*, vol. 197, pp. 11–15, 2019, doi: 10.1016/j.ultramic.2018.11.004.
- [193] V. N. Morozov and N. N. Vsevolodov, «Electrospray-neutralization method for manufacturing free and supported nanomats», *Adv. Mater.*, vol. 19, no. 24, pp. 4381–4386, 2007, doi: 10.1002/adma.200701606.
- [194] V. N. Morozov and A. Y. Mikhhev, «Water-soluble polyvinylpyrrolidone nanofilters manufactured by electrospray-neutralization technique», *J. Memb. Sci.*, vol. 403–404, pp. 110–120, 2012, doi: 10.1016/j.memsci.2012.02.028.
- [195] H. Yokoi, T. Kinoshita, and S. Zhang, «Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold.», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 24, pp. 8414–9, 2005, doi: 10.1073/pnas.0407843102.
- [196] Д. В. Багров, В. В. Прохоров, Д. В. Клинов, И. И. Агапов, И. В. Яминский, and В. Г. Богуш, «Изучение ламелей рекомбинантного белка паутины методом атомно-силовой микроскопии», *Биофизика*, Том. 56, № 1, с. 7–12, 2011.
- [197] T. C. Holmes, S. de Lacalle, X. Su, G. Liu, A. Rich, and S. Zhang, «Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds.», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 12, pp. 6728–6733, 2000, doi: 10.1073/pnas.97.12.6728.
- [198] M. Fändrich and C. M. Dobson, «The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation», *EMBO J*, vol. 21, no. 21, pp. 5682–5690, Nov. 2002.
- [199] Á. Karsai, L. Grama, Ü. Murvai, K. Soós, B. Penke, and M. S. Z. Kellermayer, «Potassium-dependent oriented growth of amyloid  $\beta$ 25–35 fibrils on mica», *Nanotechnology*, vol. 18, no. 34, p. 345102, 2007, doi: 10.1088/0957-4484/18/34/345102.
- [200] B. Dai *et al.*, «Salts drive controllable multilayered upright assembly of amyloid-like peptides at mica/water interface», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 21, pp. 8543–8548, 2013, doi: 10.1073/pnas.1220711110.
- [201] М. М. Мойсенович и др., «Фундаментальные основы использования биорезорбируемых микроносителей на основе фиброина шелка в терапевтической

- практике на примере регенерации кожи», *Терапевтический архив*, Том. 87, № 12, с. 66–72, 2015, doi: 10.17116/terarkh2015871266-72.
- [202] K. A. Luetchford, J. B. Chaudhuri, and P. A. De Bank, «Silk fibroin/gelatin microcarriers as scaffolds for bone tissue engineering», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 106, p. 110116, 2020, doi: 10.1016/j.msec.2019.110116.
- [203] R. Nazarov, H. Jin, and D. L. Kaplan, «Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin», *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 3, pp. 718–726, 2004, doi: 10.1021/bm034327e.
- [204] D. N. Rockwood, R. C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M. L. Lovett, and D. L. Kaplan, «Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin.», *Nat. Protoc.*, vol. 6, pp. 1612–31, 2011, doi: 10.1038/nprot.2011.379.
- [205] M. Puerta, M. C. Arango, N. Jaramillo-Quiceno, C. Álvarez-López, and A. Restrepo-Osorio, «Influence of ethanol post-treatments on the properties of silk protein materials», *SN Appl. Sci.*, vol. 1, no. 11, pp. 1–7, 2019, doi: 10.1007/s42452-019-1486-0.
- [206] S. Chankow, S. Luemunkong, and S. Kanokpanont, «Conformational transitions of Thai silk fibroin secondary structures», *BMEiCON 2016 - 9th Biomed. Eng. Int. Conf.*, 2017, doi: 10.1109/BMEiCON.2016.7859597.
- [207] S. Lee, S. H. Kim, Y. Y. Jo, W. T. Ju, H. B. Kim, and H. Y. Kweon, «Conformation Transition Kinetics of Silk Fibroin in Aqueous Solution Explored Using Circular Dichroism Spectroscopy», *ChemistrySelect*, vol. 6, no. 8, pp. 1735–1740, 2021, doi: 10.1002/slct.202004180.
- [208] L. Guida, M. Cavallaro, and M. Levi, «Advancements in high-resolution 3D bioprinting: Exploring technological trends, bioinks and achieved resolutions», *Bioprinting*, vol. 44, p. e00376, 2024, doi: 10.1016/j.bprint.2024.e00376.
- [209] B. Bhushan, «Adhesion and stiction: Mechanisms, measurement techniques, and methods for reduction», *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct. Process. Meas. Phenom.*, vol. 21, no. 6, pp. 2262–2296, 2003, doi: 10.1116/1.1627336.
- [210] J. S. Mcfarlane, D. Tabor, and P. R. S. L. A, «Adhesion of solids and the effect of surface films», *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.*, vol. 202, no. 1069, pp. 224–243, 1950, doi: 10.1098/rspa.1950.0096.
- [211] A. Wawkuszewski, H. Cantow, and S. N. Magonov, «Surface nano-topography of drawn polyethylene and its modification using scanning force microscopy», *Adv. Mater.*, vol. 6, no. 6, pp. 476–480, 1994, doi: 10.1002/adma.19940060607.

- [212] J. P. Cleveland, B. Anczykowski, A. E. Schmid, and V. B. Elings, «Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy», *Appl. Phys. Lett.*, vol. 72, no. 20, pp. 2613–2615, 1998, doi: 10.1063/1.121434.
- [213] M. Stark, C. Möller, D. J. Müller, and R. Guckenberger, «From Images to Interactions: High-Resolution Phase Imaging in Tapping-Mode Atomic Force Microscopy», *Biophys. J.*, vol. 80, no. 6, pp. 3009–3018, 2001, doi: 10.1016/S0006-3495(01)76266-2.
- [214] Y. Jiang *et al.*, «Surface Properties of Poly(3-hydroxybutyrate- co -3- hydroxyvalerate) Banded Spherulites Studied by Atomic Force Microscopy and Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry», *Langmuir*, vol. 19, no. 18, pp. 7417–7422, 2003, doi: 10.1021/la034865c.
- [215] А. В. Краев, С. А. Саунин, М. Е. Алексеев, В. А. Сафонов, Р. В. Тальрозе, «Температурно-деформационная приставка для сканирующей зондовой микроскопии полимеров», *Высокомолекулярные соединения*, Том. 49, № 11, с. 2026–2032, 2007.
- [216] S. S. Sheiko, M. Moller, H.-J. Cantow, and S. N. Magonov, «Scanning force microscopy of nanofibrillar structure of drawn polyethylene tapes», *Polym. Bull.*, vol. 31, no. 6, pp. 693–698, 1993, doi: 10.1007/BF00300129.
- [217] А. Л. Волынский, В. С. Логинов, Н. Ф. Бакеев, «Особенности структуры и физико-химических свойств стеклообразного полиэтилентерефталата, деформированного в адсорбционно-активной среде», *Высокомолекулярные соединения. Серия Б*, Том. 23, № 5, с. 371–376, 1981.
- [218] А. Ю. Ярышева, «Структурные аспекты получения нанокомпозитов методом крейзинга кристаллических полиолефинов в растворах полиэтиленоксида», диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук, 2013.
- [219] L. M. Robeson, «Environmental stress cracking: A review», *Polym. Eng. Sci.*, vol. 53, no. 3, pp. 453–467, Mar. 2013, doi: 10.1002/pen.23284.
- [220] Л. М. Ярышева, А. К. Беркович, А. Ю. Ярышева, М. С. Аржаков, О. В. Аржакова, and А. Л. Волынский, «Стабилизация мезопористой структуры полиэтилентерефталата, деформированного по механизму Крейзинга», *Коллоидный журнал*, Том. 83, № 2, с. 242–248, 2021, doi: 10.31857/S0023291221020130.
- [221] R. Casasola, N. L. Thomas, and S. Georgiadou, «Electrospinning of poly(lactic acid): Theoretical approach for the solvent selection to produce defect-free nanofibers», *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 54, no. 15, pp. 1483–1498, 2016, doi:

10.1002/polb.24042.

- [222] Д. В. Багров *и др.*, «Механические свойства пленок и трехмерных матриц из фиброина шелка и желатина», *Биофизика*, Том. 62, №. 1, с. 23–30, 2017.
- [223] T. Wilson, «Resolution and optical sectioning in the confocal microscope», *J. Microsc.*, vol. 244, no. 2, pp. 113–121, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2818.2011.03549.x.
- [224] J. Padrão, J. P. Silva, L. R. Rodrigues, F. Dourado, S. Lanceros-Méndez, and V. Sencadas, «Modifying fish gelatin electrospun membranes for biomedical applications: Cross-linking and swelling behavior», *Soft Mater.*, vol. 12, no. 3, pp. 247–252, 2014, doi: 10.1080/1539445X.2013.873466.
- [225] W. Tiyafoonchai, P. Chomchalao, S. Pongcharoen, M. Sutheerawattananonda, and P. Sobhon, «Preparation and characterization of blended Bombyx mori silk fibroin scaffolds», *Fibers Polym.*, vol. 12, no. 3, pp. 324–333, 2011, doi: 10.1007/s12221-011-0324-9.
- [226] B. D. Lawrence *et al.*, «Effect of hydration on silk film material properties», *Macromol. Biosci.*, vol. 10, no. 4, pp. 393–403, 2010, doi: 10.1002/mabi.200900294.
- [227] A. Katsen-Globa, N. Puetz, M. M. Gepp, J. C. Neubauer, and H. Zimmermann, «Study of SEM preparation artefacts with correlative microscopy: Cell shrinkage of adherent cells by HMDS-drying», *Scanning*, vol. 38, no. 6, pp. 625–633, 2016, doi: 10.1002/sca.21310.
- [228] A. Weiner, *Step-by-step guide to post-acquisition correlation of confocal and FIB/SEM volumes using Amira software*, 1st ed., vol. 162. Elsevier Inc., 2021. doi: 10.1016/bs.mcb.2020.09.006.
- [229] H. Schwarz and B. M. Humbel, *Correlative light and electron microscopy using immunolabeled sections*, vol. 1117. 2014. doi: 10.1007/978-1-62703-776-1\_25.
- [230] Z. Gong *et al.*, «Fluorescence and SEM correlative microscopy for nanomanipulation of subcellular structures», *Light Sci. Appl.*, vol. 3, no. 11, pp. e224–e224, 2014, doi: 10.1038/lsa.2014.105.
- [231] P. Beekman *et al.*, «Immuno-capture of extracellular vesicles for individual multi-modal characterization using AFM, SEM and Raman spectroscopy», *Lab Chip*, vol. 19, no. 15, pp. 2526–2536, 2019, doi: 10.1039/c9lc00081j.
- [232] M. Čapek, J. Janáček, and L. Kubínová, «Methods for compensation of the light attenuation with depth of images captured by a confocal microscope», *Microsc. Res. Tech.*, vol. 69, no. 8, pp. 624–635, 2006, doi: 10.1002/jemt.20330.
- [233] A. A. Mikhutkin *et al.*, «Towards Tissue Engineering: 3D Study of Polyamide-6

- Scaffolds», *Bionanoscience*, vol. 8, no. 2, pp. 511–521, 2018, doi: 10.1007/s12668-017-0493-0.
- [234] K. Kanaya and S. Okayama, «Penetration and energy-loss theory of electrons in solid targets», *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 5, no. 1, pp. 43–58, 1972, doi: 10.1088/0022-3727/5/1/308.
- [235] S. Domaschke, M. Zündel, E. Mazza, and A. E. Ehret, «A 3D computational model of electrospun networks and its application to inform a reduced modelling approach», *Int. J. Solids Struct.*, vol. 158, pp. 76–89, 2019, doi: 10.1016/j.ijsolstr.2018.08.030.
- [236] S. Domaschke *et al.*, «Predicting the macroscopic response of electrospun membranes based on microstructure and single fibre properties», *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 104, 2020, doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.103634.
- [237] M. D. Yang, X. L. Leng, and T. J. Ko, «CAD Modeling method of the electrospun membrane under multifractal dimension optimization control», *Chaos*, vol. 33, no. 6, 2023, doi: 10.1063/5.0151528.
- [238] S. Maneewongvatana and D. Mount, «Analysis of approximate nearest neighbor searching with clustered point sets», pp. 105–123, 2002, doi: 10.1090/dimacs/059/06.
- [239] L. Grella, G. Lorusso, and D. L. Adler, «Simulations of Scanning Electron Microscopy Imaging and Charging of Insulating Structures», *Scanning*, vol. 25, no. 6, pp. 300–308, 2003, doi: 10.1002/sca.4950250606.
- [240] L. Grella, G. Lorusso, P. Lee, F. Frank, and D. L. Adler, «Three-dimensional simulation of top down scanning electron microscopy images», *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct. Process. Meas. Phenom.*, vol. 22, no. 6, pp. 3399–3404, 2004, doi: 10.1116/1.1825019.
- [241] K. T. Arat, J. Boltan, T. Klimpel, and N. Unal, «Electric fields in Scanning Electron Microscopy simulations», in *Metrology, Inspection, and Process Control for Microlithography XXX*, M. I. Sanchez and V. A. Ukraintsev, Eds., 2016, p. 97780C. doi: 10.1117/12.2219182.
- [242] J. Nam, Y. Huang, S. Agarwal, and J. Lannutti, «Materials selection and residual solvent retention in biodegradable electrospun fibers», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 107, no. 3, pp. 1547–1554, 2008, doi: 10.1002/app.27063.
- [243] G. B. Yin, Y. Z. Zhang, S. D. Wang, D. B. Shi, Z. H. Dong, and W. G. Fu, «Study of the electrospun PLA/silk fibroin-gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering», *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 93, no. 1, pp. 158–163, 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32496.

- [244] E. Charpashlo, B. Ghorani, and M. Mohebbi, «Multilayered electrospinning strategy for increasing the bioaccessibility of lycopene in gelatin-based sub-micron fiber structures», *Food Hydrocoll.*, vol. 113, p. 106411, 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106411.
- [245] N. Detta *et al.*, «Novel electrospun polyurethane/gelatin composite meshes for vascular grafts.», *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 5, pp. 1761–9, 2010, doi: 10.1007/s10856-010-4006-8.
- [246] X. Qin, «Coaxial electrospinning of nanofibers», in *Electrospun Nanofibers*, Elsevier, 2017, pp. 41–71. doi: 10.1016/B978-0-08-100907-9.00003-9.
- [247] Y. Lu *et al.*, «Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering.», *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 8, no. 5, pp. 654–77, 2016, doi: 10.1002/wnan.1391.
- [248] I. Chummun, A. Bhaw-Luximon, and D. Jhurry, «Modulating matrix-multicellular response using polysucrose-blended with poly-L-lactide or polydioxanone in electrospun scaffolds for skin tissue regeneration», *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 106, no. 12, pp. 3275–3291, 2018, doi: 10.1002/jbm.a.36527.
- [249] M. Buzgo, A. Mickova, M. Rampichova, and M. Doupnik, «Blend electrospinning, coaxial electrospinning, and emulsion electrospinning techniques», in *Core-Shell Nanostructures for Drug Delivery and Theranostics*, Elsevier, 2018, pp. 325–347. doi: 10.1016/B978-0-08-102198-9.00011-9.
- [250] S. K. Tiwari and S. Venkatraman, «Electrospinning pure protein solutions in core–shell fibers», *Polym. Int.*, vol. 61, no. 10, pp. 1549–1555, 2012, doi: 10.1002/pi.4246.
- [251] T. Xia *et al.*, «The combination of db-cAMP and ChABC with poly(propylene carbonate) microfibers promote axonal regenerative sprouting and functional recovery after spinal cord hemisection injury», *Biomed. Pharmacother.*, vol. 86, pp. 354–362, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.045.
- [252] S. K. Murase, L. J. Del Valle, S. Kobauri, R. Katsarava, and J. Puiggali, «Electrospun fibrous mats from a l-phenylalanine based poly(ester amide): Drug delivery and accelerated degradation by loading enzymes», *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 119, pp. 275–287, 2015, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.05.018.
- [253] B. Duan *et al.*, «Degradation of electrospun PLGA-chitosan/PVA membranes and their cytocompatibility in vitro», *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 18, no. 1, pp. 95–115, 2007, doi: 10.1163/156856207779146105.
- [254] B.-Y. Wang *et al.*, «Electrospun polylactide/poly(ethylene glycol) hybrid fibrous scaffolds for tissue engineering», *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 100A, no. 2, pp.

- 441–449, 2012, doi: 10.1002/jbm.a.33264.
- [255] X. Zhou *et al.*, «Biocompatibility and biodegradation properties of polycaprolactone/polydioxanone composite scaffolds prepared by blend or co-electrospinning», *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 34, no. 2, pp. 115–130, 2019, doi: 10.1177/0883911519835569.
- [256] C. Ferrero, D. Massuelle, and E. Doelker, «Towards elucidation of the drug release mechanism from compressed hydrophilic matrices made of cellulose ethers. II. Evaluation of a possible swelling-controlled drug release mechanism using dimensionless analysis», *J. Control. Release*, vol. 141, no. 2, pp. 223–233, 2010, doi: 10.1016/j.jconrel.2009.09.011.
- [257] R. W. Korsmeyer and N. A. Peppas, «Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs», *J. Memb. Sci.*, vol. 9, no. 3, pp. 211–227, 1981, doi: 10.1016/S0376-7388(00)80265-3.
- [258] Y. Yang, X. Li, W. Cui, S. Zhou, R. Tan, and C. Wang, «Structural stability and release profiles of proteins from core-shell poly (DL-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning», *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 86, no. 2, pp. 374–385, 2008, doi: 10.1002/jbm.a.31595.
- [259] P. L. Ritger and N. A. Peppas, «A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs», *J. Control. Release*, vol. 5, no. 1, pp. 23–36, 1987, doi: 10.1016/0168-3659(87)90034-4.
- [260] D. M. Correia *et al.*, «Influence of electrospinning parameters on poly(hydroxybutyrate) electrospun membranes fiber size and distribution», *Polym. Eng. Sci.*, vol. 54, no. 7, pp. 1608–1617, 2014, doi: 10.1002/pen.23704.
- [261] K. Sombatmankhong, O. Suwantong, S. Waleetorncheepsawat, and P. Supaphol, «Electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), and their blends», *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 44, no. 19, pp. 2923–2933, 2006, doi: 10.1002/polb.20915.
- [262] A. C. Areias *et al.*, «Influence of crystallinity and fiber orientation on hydrophobicity and biological response of poly(l-lactide) electrospun mats», *Soft Matter*, vol. 8, no. 21, pp. 5818–5825, 2012, doi: 10.1039/C2SM25557J.
- [263] U. Stachewicz, R. J. Bailey, H. Zhang, C. A. Stone, C. R. Willis, and A. H. Barber, «Wetting Hierarchy in Oleophobic 3D Electrospun Nanofiber Networks», *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 30, pp. 16645–16652, 2015, doi: 10.1021/acsami.5b04272.

- [264] A. B. D. Cassie and S. Baxter, «Wettability of porous surfaces», *Trans. Faraday Soc.*, vol. 40, no. 5, p. 546, 1944, doi: 10.1039/tf9444000546.
- [265] M. Ma, Y. Mao, M. Gupta, K. K. Gleason, and G. C. Rutledge, «Superhydrophobic Fabrics Produced by Electrospinning and Chemical Vapor Deposition», *Macromolecules*, vol. 38, no. 23, pp. 9742–9748, 2005, doi: 10.1021/ma0511189.
- [266] M. Bognitzki *et al.*, «Preparation of fibers with nanoscaled morphologies: Electrospinning of polymer blends», *Polym. Eng. Sci.*, vol. 41, no. 6, pp. 982–989, 2001, doi: 10.1002/pen.10799.
- [267] L. Wu, J. Park, Y. Kamaki, and B. Kim, «Optimization of the fused deposition modeling-based fabrication process for polylactic acid microneedles», *Microsystems Nanoeng.*, vol. 7, no. 1, p. 58, 2021, doi: 10.1038/s41378-021-00284-9.
- [268] S. Nivedita, D. Ahamed, and S. Joseph, «Thermodynamic analysis of phase diagram of H<sub>2</sub>O-DMF-PCL system: investigation on the influence of inorganic additives TiO<sub>2</sub>/MMT», *J. Mater. Sci.*, vol. 55, no. 13, pp. 5431–5444, 2020, doi: 10.1007/s10853-020-04386-z.
- [269] J. A. Gonzales-Leon, A. M. Mayes, J. A. Gonzalez-Leon, and A. M. Mayes, «Phase Behavior Prediction of Ternary Polymer Mixtures», *Macromolecules*, vol. 36, no. 7, pp. 2508–2515, 2003, doi: 10.1021/ma0209803.
- [270] S. Megelski, J. S. Stephens, D. Bruce Chase, J. F. Rabolt, D. B. Chase, and J. F. Rabolt, «Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers», *Macromolecules*, vol. 35, no. 22, pp. 8456–8466, 2002, doi: 10.1021/ma020444a.
- [271] H.-S. Bae, A. Haider, K. M. K. Selim, D.-Y. Kang, E.-J. Kim, and I.-K. Kang, «Fabrication of highly porous PMMA electrospun fibers and their application in the removal of phenol and iodine», *J. Polym. Res.*, vol. 20, no. 7, pp. 158-1–7, 2013, doi: 10.1007/s10965-013-0158-9.
- [272] M. Chen, P. K. Patra, S. B. Warner, and S. Bhowmick, «Role of fiber diameter in adhesion and proliferation of NIH 3T3 fibroblast on electrospun polycaprolactone scaffolds.», *Tissue Eng.*, vol. 13, no. 3, pp. 579–587, 2007, doi: 10.1089/ten.2007.13.ft-340.
- [273] S. Shahverdi *et al.*, «Fabrication and structure analysis of poly(lactide-co-glycolic acid)/silk fibroin hybrid scaffold for wound dressing applications», *Int. J. Pharm.*, vol. 473, no. 1–2, pp. 345–355, 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.07.021.
- [274] R. Casasola, N. L. Thomas, A. Trybala, and S. Georgiadou, «Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: Effect of different solvent systems on fibre morphology and

- diameter», *Polymer*, vol. 55, no. 18, pp. 4728–4737, 2014, doi: 10.1016/j.polymer.2014.06.032.
- [275] F. Topuz and T. Uyar, «Electrospinning of gelatin with tunable fiber morphology from round to flat/ribbon», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 80, pp. 371–378, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.06.001.
- [276] Y. Liao, «Practical Electron Microscopy and Database», 2006.
- [277] K. A. Esmonde-White, G. S. Mandair, F. Raaij, B. J. Roessler, and M. D. Morris, «Raman spectroscopy of dried synovial fluid droplets as a rapid diagnostic for knee joint damage», *Biomed. Opt. Spectrosc.*, vol. 6853, no. 68530, p. 68530Y, 2008, doi: 10.1117/12.770360.
- [278] V. J. C. Lin and J. L. Koenig, «Raman studies of bovine serum albumin», *Biopolymers*, vol. 15, no. 1, pp. 203–218, 1976, doi: 10.1002/bip.1976.360150114.
- [279] K. Vano-Herrera, A. Misiun, and C. Vogt, «Preparation and characterization of poly(lactic acid)/poly(methyl methacrylate) blend tablets for application in quantitative analysis by micro Raman spectroscopy», *J. Raman Spectrosc.*, vol. 46, no. 2, pp. 273–279, 2015, doi: 10.1002/jrs.4603.
- [280] T. Furukawa *et al.*, «Raman microspectroscopy study of structure, dispersibility, and crystallinity of poly(hydroxybutyrate)/poly(l-lactic acid) blends», *Polymer*, vol. 47, no. 9, pp. 3132–3140, 2006, doi: 10.1016/j.polymer.2006.03.010.
- [281] G. Kister, G. Cassanas, and M. Vert, «Effects of morphology, conformation and configuration on the IR and Raman spectra of various poly(lactic acid)s», *Polymer*, vol. 39, no. 2, pp. 267–273, 1998, doi: 10.1016/S0032-3861(97)00229-2.
- [282] P. J. Larkin, «Basic Principles», in *Infrared and Raman Spectroscopy*, Elsevier, 2018, pp. 7–28. doi: 10.1016/B978-0-12-804162-8.00002-1.
- [283] D. A. Long and P. R. S. L. A., «Intensities in Raman spectra I. A bond polarizability theory», *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.*, vol. 217, no. 1129, pp. 203–221, 1953, doi: 10.1098/rspa.1953.0057.
- [284] C. Choe *et al.*, «Quantitative determination of concentration profiles of skin components and topically applied oils by tailored multivariate curve resolution-alternating least squares using in vivo confocal Raman micro-spectroscopy», *J. Biophotonics*, vol. 16, no. 2, 2023, doi: 10.1002/jbio.202200219.
- [285] K. A. Prokhorov *et al.*, «Raman structural study of melt-mixed blends of isotactic polypropylene with polyethylene of various densities», *Laser Phys.*, vol. 28, no. 4, 2018, doi: 10.1088/1555-6611/aaa9f7.

- [286] R. Rezakhaniha *et al.*, «Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy», *Biomech. Model. Mechanobiol.*, vol. 11, no. 3–4, pp. 461–473, 2012, doi: 10.1007/s10237-011-0325-z.
- [287] B. Jähne, *Digital Image Processing*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1995. doi: 10.1007/978-3-662-03174-2.
- [288] Z. Püspöki, M. Storath, D. Sage, and M. Unser, «Transforms and Operators for Directional Bioimage Analysis: A Survey», in *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*, vol. 219, 2016, pp. 69–93. doi: 10.1007/978-3-319-28549-8\_3.
- [289] E. Soliman *et al.*, «Aligned electrospun fibers for neural patterning», *Biotechnol. Lett.*, vol. 40, no. 3, pp. 601–607, 2018, doi: 10.1007/s10529-017-2494-z.
- [290] W. Wang *et al.*, «Effects of Schwann cell alignment along the oriented electrospun chitosan nanofibers on nerve regeneration», *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 91A, no. 4, pp. 994–1005, 2009, doi: 10.1002/jbm.a.32329.
- [291] K. Aviss, J. Gough, and S. Downes, «Aligned electrospun polymer fibres for skeletal muscle regeneration», *Eur. Cells Mater.*, vol. 19, pp. 193–204, 2010, doi: 10.22203/eCM.v019a19.
- [292] W. J. Li, R. L. Mauck, J. a. Cooper, X. Yuan, and R. S. Tuan, «Engineering controllable anisotropy in electrospun biodegradable nanofibrous scaffolds for musculoskeletal tissue engineering», *J. Biomech.*, vol. 40, no. 8, pp. 1686–1693, 2007, doi: 10.1016/j.jbiomech.2006.09.004.
- [293] M. Sadrjahani, A. A. Gharehaghaji, and M. Javanbakht, «Aligned electrospun sulfonated polyetheretherketone nanofiber based proton exchange membranes for fuel cell applications», *Polym. Eng. Sci.*, vol. 57, no. 8, pp. 789–796, 2017, doi: 10.1002/pen.24453.
- [294] J. M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, and N. . Beck Tan, «The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles», *Polymer*, vol. 42, no. 1, pp. 261–272, 2001, doi: 10.1016/S0032-3861(00)00250-0.
- [295] A. Marcilla and M. Beltran, «MECHANISMS OF PLASTICIZERS ACTION», in *Handbook of Plasticizers*, 2012, pp. 119–133. doi: 10.1016/b978-1-895198-50-8.50007-2.
- [296] C. Gualandi *et al.*, «Ethanol disinfection affects physical properties and cell response of electrospun poly(l-lactic acid) scaffolds», *Eur. Polym. J.*, vol. 48, no. 12, pp. 2008–2018, 2012, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2012.09.016.
- [297] Y. Shinkawa, Y. Hayashi, S. Sato, and K. Nagai, «Permeability of ethanol solution

- through poly(lactic acid) film», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 23, pp. 1–9, 2015, doi: 10.1002/app.42031.
- [298] R. M. Albrecht, D. H. Rasmussen, C. S. Keller, and R. D. Hinsdill, «Preparation of cultured cells for SEM: air drying from organic solvents», *J. Microsc.*, vol. 108, no. 1, pp. 21–29, 1976, doi: 10.1111/j.1365-2818.1976.tb01075.x.
- [299] P. Moran and B. Coats, «Biological Sample Preparation for SEM Imaging of Porcine Retina», *Microsc. Today*, vol. 20, no. 02, pp. 28–31, 2012, doi: 10.1017/S1551929511001374.
- [300] E. R. Fischer, B. T. Hansen, V. Nair, F. H. Hoyt, and D. W. Dorward, «Scanning Electron Microscopy», in *Current Protocols in Microbiology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. doi: 10.1002/9780471729259.mc02b02s25.
- [301] J. L. Nation, «A New Method Using Hexamethyldisilazane for Preparation of Soft Insect Tissues for Scanning Electron Microscopy», *Stain Technol.*, vol. 58, no. 6, pp. 347–351, 1983, doi: 10.3109/10520298309066811.
- [302] J. T. Y. Lee and K. L. Chow, «SEM sample preparation for cells on 3D scaffolds by freeze-drying and HMDS», *Scanning*, vol. 34, no. 1, pp. 12–25, 2012, doi: 10.1002/sca.20271.
- [303] D. F. Bray, J. Bagu, and P. Koegler, «Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens», *Microsc. Res. Tech.*, vol. 26, no. 6, pp. 489–495, 1993, doi: 10.1002/jemt.1070260603.
- [304] Y. Jusman, S. C. Ng, and N. A. Abu Osman, «Investigation of CPD and HMDS sample preparation techniques for cervical cells in developing computer-aided screening system based on FE-SEM/EDX», *Sci. World J.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/289817.
- [305] V. Hegde, A. Mason, T. Saliev, F. J. D. Smith, W. H. I. McLean, and P. A. Campbell, «Scanning ion conductance microscopy of live keratinocytes», *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 371, 2012, doi: 10.1088/1742-6596/371/1/012023.
- [306] M. P. Prabhakaran, J. R. Venugopal, and S. Ramakrishna, «Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering», *Biomaterials*, vol. 30, no. 28, pp. 4996–5003, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.057.
- [307] D. K. Swain, M. S. Kushwah, M. Kaur, T. K. Patbandha, A. K. Mohanty, and A. K. Dang, «Formation of NET, phagocytic activity, surface architecture, apoptosis and expression of toll like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) in neutrophils of mastitic

- cows», *Vet. Res. Commun.*, vol. 38, no. 3, pp. 209–219, 2014, doi: 10.1007/s11259-014-9606-1.
- [308] H. B. Wang, M. E. Mullins, J. M. Cregg, C. W. McCarthy, and R. J. Gilbert, «Varying the diameter of aligned electrospun fibers alters neurite outgrowth and Schwann cell migration», *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 8, pp. 2970–2978, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.02.020.
- [309] J. Wu *et al.*, «Highly oriented hydrogels for tissue regeneration: design strategies, cellular mechanisms, and biomedical applications», *Theranostics*, vol. 14, no. 5, pp. 1982–2035, 2024, doi: 10.7150/thno.89493.
- [310] A. I. Teixeira, P. F. Nealey, and C. J. Murphy, «Responses of human keratocytes to micro- and nanostructured substrates», *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 71, no. 3, pp. 369–376, 2004, doi: 10.1002/jbm.a.30089.
- [311] D. E. Heath, J. J. Lannutti, and S. L. Cooper, «Electrospun scaffold topography affects endothelial cell proliferation, metabolic activity, and morphology», *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 94, no. 4, pp. 1195–1204, 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32802.
- [312] A. K. Gaharwar, M. Nikkhah, S. Sant, and A. Khademhosseini, «Anisotropic poly (glycerol sebacate)-poly ( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun fibers promote endothelial cell guidance», *Biofabrication*, vol. 7, no. 1, p. 015001, 2014, doi: 10.1088/1758-5090/7/1/015001.
- [313] C. A. Bashur, L. A. Dahlgren, and A. S. Goldstein, «Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) meshes.», *Biomaterials*, vol. 27, no. 33, pp. 5681–8, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.005.
- [314] N. F. Huang *et al.*, «Myotube Assembly on Nanofibrous and Micropatterned Polymers», *Nano Lett.*, vol. 6, no. 3, pp. 537–542, 2006, doi: 10.1021/nl060060o.
- [315] C. Leclech and C. Villard, «Cellular and Subcellular Contact Guidance on Microfabricated Substrates.», *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, p. 551505, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.551505.
- [316] F. Badique *et al.*, «Directing nuclear deformation on micropillared surfaces by substrate geometry and cytoskeleton organization», *Biomaterials*, vol. 34, no. 12, pp. 2991–3001, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.018.
- [317] P. M. Davidson, O. Fromigué, P. J. Marie, V. Hasirci, G. Reiter, and K. Anselme, «Topographically induced self-deformation of the nuclei of cells: Dependence on cell type and proposed mechanisms», *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 3, pp. 939–

- 946, 2010, doi: 10.1007/s10856-009-3950-7.
- [318] S. B. Khatau *et al.*, «A perinuclear actin cap regulates nuclear shape», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 45, pp. 19017–19022, 2009, doi: 10.1073/pnas.0908686106.
- [319] M. J. Dalby, M. O. Riehle, S. J. Yarwood, C. D. W. Wilkinson, and A. S. G. Curtis, «Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: Response to a micro-grooved topography», *Exp. Cell Res.*, vol. 284, no. 2, pp. 274–282, 2003, doi: 10.1016/S0014-4827(02)00053-8.
- [320] L. E. McNamara *et al.*, «The role of microtopography in cellular mechanotransduction», *Biomaterials*, vol. 33, no. 10, pp. 2835–2847, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.047.
- [321] B. C. Bukowski, F. J. Keil, P. I. Ravikovitch, G. Sastre, R. Q. Snurr, and M. O. Coppens, *Connecting theory and simulation with experiment for the study of diffusion in nanoporous solids*, vol. 27, no. 5. Springer US, 2021. doi: 10.1007/s10450-021-00314-y.
- [322] P. V. Danckwerts, «Continuous flow systems», *Chem. Eng. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–13, 1953, doi: 10.1016/0009-2509(53)80001-1.
- [323] A. M. Merlot, D. S. Kalinowski, and D. R. Richardson, «Unraveling the mysteries of serum albumin — more than just a serum protein», *Front. Physiol.*, vol. 5, p. 299, 2014, doi: 10.3389/fphys.2014.00299.
- [324] M. Mahmoudifard, M. Vossoughi, and M. Soleimani, «Different types of electrospun nanofibers and their effect on microfluidic-based immunoassay», *Polym. Adv. Technol.*, vol. 30, no. 4, pp. 973–982, 2019, doi: 10.1002/pat.4531.
- [325] S. J. Lee, R. Tatavarty, and M. B. Gu, «Electrospun polystyrene-poly(styrene-co-maleic anhydride) nanofiber as a new aptasensor platform», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 38, no. 1, pp. 302–307, 2012, doi: 10.1016/j.bios.2012.06.009.
- [326] L. Medda, M. Monduzzi, and A. Salis, «The molecular motion of bovine serum albumin under physiological conditions is ion specific», *Chem. Commun.*, vol. 51, no. 30, pp. 6663–6666, 2015, doi: 10.1039/C5CC01538C.
- [327] A. K. Gaigalas, J. B. Hubbard, M. McCurley, and S. Woo, «Diffusion of bovine serum albumin in aqueous solutions», *J. Phys. Chem.*, vol. 96, no. 5, pp. 2355–2359, 1992, doi: 10.1021/j100184a063.
- [328] A. Frutiger, A. Tanno, S. Hwu, R. F. Tiefenauer, J. Vörös, and N. Nakatsuka, «Nonspecific Binding - Fundamental Concepts and Consequences for Biosensing Applications», *Chem. Rev.*, vol. 121, no. 13, pp. 8095–8160, 2021, doi:

- 10.1021/acs.chemrev.1c00044.
- [329] M. Stenberg and H. Nygren, «Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces», *J. Immunol. Methods*, vol. 113, no. 1, pp. 3–15, 1988, doi: 10.1016/0022-1759(88)90376-6.
- [330] J. P. P. Landry, Y. Ke, G.-L. L. Yu, and X. D. D. Zhu, «Measuring affinity constants of 1450 monoclonal antibodies to peptide targets with a microarray-based label-free assay platform», *J. Immunol. Methods*, vol. 417, pp. 86–96, 2015, doi: 10.1016/j.jim.2014.12.011.
- [331] J. L. Pellequer and M. H. V. Van Regenmortel, «Measurement of kinetic binding constants of viral antibodies using a new biosensor technology», *J. Immunol. Methods*, vol. 166, no. 1, pp. 133–143, 1993, doi: 10.1016/0022-1759(93)90337-7.
- [332] H.-K. Cho, S.-M. Seo, I.-H. Cho, S.-H. Paek, D.-H. Kim, and S.-H. Paek, «Minimum-step immuno-analysis based on continuous recycling of the capture antibody», *Analyst*, vol. 136, no. 7, p. 1374, 2011, doi: 10.1039/c0an00811g.
- [333] T. H. Meltzer and M. W. Jornitz, «The Sterilizing Filter and Its Pore Size Rating», *Am. Pharm. Rev.*, pp. 1–5, 2003.
- [334] S. Nartker and L. T. Drzal, «Electrospun Cellulose Nitrate Nanofibers», *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 10, no. 9, pp. 5810–5813, 2010, doi: 10.1166/jnn.2010.2447.
- [335] A. E. Manis, J. R. Bowman, G. L. Bowlin, and D. G. Simpson, «Electrospun nitrocellulose and nylon: Design and fabrication of novel high performance platforms for protein blotting applications», *J. Biol. Eng.*, vol. 1, pp. 1–11, 2007, doi: 10.1186/1754-1611-1-2.
- [336] X. Wang, D. Yang, S. T. Jia, L. L. Zhao, T. T. Jia, and C. H. Xue, «Electrospun nitrocellulose membrane for immunochromatographic test strip with high sensitivity», *Microchim. Acta*, vol. 187, no. 12, p. 644, 2020, doi: 10.1007/s00604-020-04626-8.

### **Список сокращений и обозначений**

ААС – адсорбционно-активная среда

АОО – анодированный оксид алюминия

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АТ – антитела

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией

ГМДС – гексаметилдисилазан

ГФИП – 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол

ДМФА – диметилформамид

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ИЛ16 – интерлейкин-1 бета

ИФА – иммуноферментный анализ

КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

КР-спектроскопия – спектроскопия комбинационного рассеяния

МЖ – метакрилированный желатин

МТ – мелатонин

МФ – метакрилированный фиброин

НЦ – нитроцеллюлоза

ПАН – полиакрилонитрил

ПБТ – полибутилентерефталат

ПВДФ – поливинилиденфторид

ПВП – поливинилпирролидон

ПВС – поливиниловый спирт

ПДО – полидиоксанон

ПК – поликарбонат

ПКЛ – поли(ε-капролактон)

ПЛА – полилактид

ПЛГА – сополимер молочной и гликолевой кислоты (полилактид-со-гликолид)

ПММА – полиметилметакрилат

ПОБВ – поли(оксибутират-со-оксивалерат)

ПП – полипропилен

ППДЛ – поли(ω-пентадекалактон)

ПС – полистирол  
 ПХ – пероксидаза хрена  
 ПЭ – полиэтилен  
 ПЭВП – полиэтилен высокой плотности  
 ПЭО – полиэтиленоксид  
 ПЭТФ – полиэтилентерефталат  
 РМА – рентгеновский микроанализ  
 СРБ – С-реактивный белок  
 СЭМ – сканирующая электронная микроскопия  
 ТГФ – тетрагидрофуран  
 ТМБ – тетраметилбензидин  
 ТФА – трифторуксусная кислота  
 ФЭУ – фотоэлектронный умножитель  
 ЭФ – электроформованный  
 ЯМР – ядерный магнитный резонанс  
 BMP – Bone Morphogenetic Protein (костный морфогенетический белок)  
 CPD – Critical Point Drying (сушка в критической точке)  
 ECL – Enhanced Chemiluminescence (усиленная хемилюминесценция)  
 EDC/NHS – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид / N-гидроксисукцинимид  
 FITC – Fluorescein Isothiocyanate (флуоресцеин изотиоцианат)  
 HaCaT – Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes (линия кератиноцитов человека)  
 HMDS – Hexamethyldisilazane (гексаметилдисилазан)  
 HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells (клетки эндотелия пупочной вены человека)  
 IgG – Immunoglobulin G (иммуноглобулин класса G)  
 LFA – Lateral Flow Assay (иммунохроматографический анализ в тест-полосках)  
 NA – Numerical Aperture (числовая апертура)  
 PBS – Phosphate-Buffered Saline (фосфатно-солевой буфер)  
 PBST – Phosphate-Buffered Saline with Tween 20 (фосфатно-солевой буфер с добавленным реагентом Tween 20)  
 RGD – аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (пептидная последовательность)  
 SPF – Smallest Printed Feature (минимальный размер сформированной структуры)  
 ThT – Thioflavin T (тиофлавин T)

TRITC – Tetramethylrhodamine Isothiocyanate (тетраметилродамин изотиоцианат)

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor (фактор роста эндотелия сосудов)