



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология
ООП «Перспективные химические и биомедицинские технологии»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА МАГИСТРАНТА

Тема работы
Получение и исследование пьезополимерных матриц на основе полиоксибутирата и магнетита биомедицинского назначения

УДК 615.4:661.8'071.4:549.74

Обучающийся

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Шлапакова Лада Евгеньевна		

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Сурменев Р.А.	д.т.н., доцент		

КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Маланина В.А.	к.э.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Авдеева И.И.			

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Романенко С.В.	д.х.н.		

**ПЛАНИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОСВОЕНИЯ ООП
«Перспективные химические и биомедицинские технологии»**

Код компетенции	Наименование компетенции
Универсальные компетенции	
УК(У)-1	Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, выработать стратегию действий;
УК(У)-2	Способен управлять проектом на всех этапах его жизненного цикла;
УК(У)-3	Способен организовывать и руководить работой команды, выработывая командную стратегию для достижения поставленной цели;
УК(У)-4	Способен применять современные коммуникативные технологии, в том числе на иностранном (-ых) языке (-ах), для академического и профессионального взаимодействия;
УК(У)-5	Способен анализировать и учитывать разнообразие культур в процессе межкультурного взаимодействия;
УК(У)-6	Способен определять и реализовывать приоритеты собственной деятельности и способы ее совершенствования на основе самооценки.
Общепрофессиональные компетенции	
ОПК(У)-1	Способен организовать самостоятельную и коллективную научно-исследовательскую работу, разрабатывать планы и программы проведения научных исследований и технических разработок;
ОПК(У)-2	Способен использовать современные приборы и методики, организовать проведение экспериментов и испытаний, проводить их обработку и анализировать их результаты
ОПК(У)-3	Способен разрабатывать нормы выработки, технологические нормативы на расход материалов, заготовок, топлива и электроэнергии, контролировать параметры технологического процесса, выбирать оборудование и технологическую оснастку
ОПК(У)-4	Способен находить оптимальные решения при создании продукции с учетом требований качества, надежности и стоимости, а также сроков исполнения, безопасности жизнедеятельности и экологической чистоты.
Профессиональные компетенции выпускников	
ПК(У)-1	Способен к поиску, обработке, анализу и систематизации научно-технической информации по теме исследования, выбору методик и средств решения задачи
ПК(У)-2	Способен к созданию химических соединений, материалов и изделий биомедицинского назначения и (или) их физико-химического анализа
ПК(У)-3	Способен к применению методов математического моделирования химических соединений, материалов биомедицинского назначения и процессов химических и биомедицинских технологий
ПК(У)-4	Способен к защите объектов интеллектуальной собственности и коммерциализации прав на объекты интеллектуальной собственности
ПК (У)-5	Способен проектировать и организовывать учебный процесс по образовательным программам с использованием современных образовательных технологий

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное образовательное учреждение
 высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
 ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий
 Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология
 ООП «Перспективные химические и биомедицинские технологии»

УТВЕРЖДАЮ:
 Руководитель ООП
 18.04.01 Химическая технология
 _____ С.В. Романенко
 14.03.2023 г.

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

Обучающийся:

Группа	ФИО
9ДМ11	Шлапакова Лада Евгеньевна

Тема работы:

Получение и исследование пьезополимерных матриц на основе полиоксидбутирата и магнетита биомедицинского назначения	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	34-38/с от 03.02.2023 г.

Срок сдачи обучающимся выполненной работы:	13.06.2023 г.
--	---------------

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

<p>Исходные данные к работе</p> <p><i>(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).</i></p>	<p>Магнитные композитные кондуиты на основе поли-3-оксибутирата и 8 мас. % наночастиц магнетита, модифицированных лимонной кислотой. Кондуиты изготавливаются методом электроформования (ЭФ) и применяются для регенерации повреждений периферической нервной системы. Кондуиты представляют собой полые трубки длиной 15 мм с внутренним диаметром 2 мм и толщиной стенки 150–200 мкм. Диаметр электроформованных волокон 1 мкм. Кондуиты должны обладать биоразлагаемостью и биосовместимостью; высоким значением намагниченности; пористостью свыше 80 %;</p>
---	--

	механическими свойствами, схожими с нервной тканью.
<p>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</p> <p><i>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</i></p>	<p>1) обзор литературы с целью выявления требований к свойствам кондуитов;</p> <p>2) оптимизация параметров ЭФ для получения кондуитов с заданными составом и структурой;</p> <p>3) исследование морфологии, топографии, кристаллической структуры, химического и фазового состава, магнитных и физико-механических свойств кондуитов;</p> <p>4) исследование адгезии и пролиферации клеток на поверхности кондуитов при воздействии низкочастотного магнитного поля;</p> <p>5) анализ, обсуждение и описание полученных экспериментальных данных; сравнение их с литературой.</p>
<p>Перечень графического материала <i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i></p>	Не предусмотрено
<p>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы <i>(с указанием разделов)</i></p>	
Раздел	Консультант
Социальная ответственность	Авдеева Ирина Ивановна, старший преподаватель ООД ШБИП
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Маланина Вероника Анатольевна, доцент ОСГН ШБИП
Раздел ВКР на иностранном языке	Гончарова Любовь Анатольевна, доцент ОИЯ ШБИП
<p>Название раздела на русском и иностранном языках:</p> <p>1 Обзор литературы</p>	
<p>Названия разделов на русском языке:</p> <p>2 Материалы и методы; 3 Результаты и обсуждение; 4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение; 5 Социальная ответственность</p>	
<p>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</p>	14.03.2023 г.

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Сурменев Р.А.	д.т.н., доцент		14.03.2023 г.

Задание принял к исполнению обучающийся:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Шлапакова Лада Евгеньевна		14.03.2023 г.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное образовательное учреждение
 высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
 ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий
 Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология
 ООП «Перспективные химические и биомедицинские технологии»
 Уровень образования магистратура
 Период выполнения весенний семестр 2022/2023 учебного года

КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН
выполнения выпускной квалификационной работы

Обучающийся:

Группа	ФИО
9ДМ11	Шлапакова Лада Евгеньевна

Тема работы:

Получение и исследование пьезополимерных матриц на основе полиоксибутирата и магнетита биомедицинского назначения

Срок сдачи студентом выполненной работы:	13.06.2021 г.
--	---------------

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
22.03.2023 г.	Разработка раздела «Введение»	10
05.04.2023 г.	Разработка раздела «Обзор литературы»	10
19.04.2023 г.	Разработка раздела «Материалы и методы»	10
10.05.2023 г.	Разработка разделов «Результаты и обсуждение»	10
24.05.2023 г.	Разработка разделов «Социальная ответственность» и «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	10
01.06.2023 г.	Оформление ВКР	10
15.06.2023 г.	Представление ВКР	40

СОСТАВИЛ:**Руководитель ВКР**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Сурменев Р.А.	д.т.н., доцент		15.03.2023

СОГЛАСОВАНО:**Руководитель ООП**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Романенко С.В.	д.х.н.		15.03.2023

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 141 с., 17 рис., 21 табл., 187 источников, 1 прил.

Ключевые слова: поли-3-оксибутират, магнетит, электроформование, тканевая инженерия, скэффолд, конduit.

Объектом исследования являются магнитные композитные кондуиты для восстановления нервной ткани на основе поли-3-оксибутирата (ПОБ) и магнетита, модифицированного лимонной кислотой.

Цель работы – получение и исследование физико-химических и биологических свойств кондуитов на основе биоразлагаемого поли-3-оксибутирата и магнитных наночастиц (МНЧ).

В ходе работы были получены магнитные композитные кондуиты методом электроформования. Далее было проведено комплексное исследование морфологии, топографии, кристаллической структуры, химического состава, физико-химических и магнитных свойств кондуитов. *In vitro* были исследованы адгезия и пролиферация мезенхимальных стволовых клеток и нейробластомы человека на поверхности кондуитов под воздействием низкочастотного магнитного поля.

В результате исследований разработан перспективный материал для дальнейших доклинических испытаний и клинического применения в восстановлении травм периферической нервной системы. Научная значимость заключается в создании кондуитов нового улучшенного состава, а также в описании влияния МНЧ на топографию, кристаллическую структуру, физико-механические и магнитные свойства полимерных кондуитов. Помимо этого, исследовано влияние внешнего низкочастотного магнитного поля на биологическую активность разработанных материалов.

Основные конструктивные, технологические и технико-эксплуатационные характеристики: Кондуиты представляют собой полые трубки длиной 15 мм с внутренним диаметром 2 мм и толщиной стенки 200 мкм. Стенка кондуитов обладает проницаемой микроволокнуистой структурой с пористостью 82 %. Диаметр волокон в композитном кондуите составляет $1,2 \pm 0,1$ мкм. Намагниченность насыщения кондуита с добавлением 8 мас. % МНЧ составляет 7,5 эме/г; степень кристалличности составляет 54 %. Максимальная прочность на растяжение, удлинение до разрыва и модуль Юнга кондуита ПОБ/Fe₃O₄-ЛК составляют $3,9 \pm 0,7$ МПа, $28,6 \pm 2,9$ % и 221 ± 52 МПа, соответственно. Краевой угол смачивания поверхности материала составляет $125,7 \pm 1,1^\circ$. Клеточные эксперименты *in vitro* проводились при воздействии переменного магнитного поля с частотой и индукцией, равными 0,3 Гц и 60 мТл, соответственно.

Степень внедрения: показана биосовместимость и биоактивность материала на двух клеточных культурах *in vitro*. Активно ведутся *in vivo* эксперименты по регенерации дефектов седалищных нервов крыс с применением разработанных материалов.

Область применения: регенеративная медицина нервной ткани, восстановление дефектов периферических нервов.

Экономическая эффективность/значимость работы: применение полученных материалов может предотвратить необратимую потерю двигательной и сенсорной функций в травмированной области, что улучшит качество жизни десятков миллионов пациентов во всем мире. Предложенные кондуиты могут преодолеть недостатки, связанные с существующим общепринятым подходом к лечению повреждений ПНС.

В будущем планируется совершенствование структуры, состава и поверхностных свойств магнитных композитных кондуитов и оценка эффективности восстановления нервных дефектов с их применением в магнитном поле *in vivo*.

Содержание

Введение	13
Обозначения и сокращения	15
1 Обзор литературы.....	17
1.1 Общие требования к кондуитам для восстановления нервов.....	17
1.2 Методы получения кондуитов для инженерии нервной ткани	19
1.3 Пьезоэлектрическая стимуляция восстановления нервной ткани	19
1.4 Полиоксиданканоаты и их модификации для инженерии нервной ткани	23
1.5 Магнитоактивные материалы для инженерии нервной ткани	29
2 Материалы и методы.....	31
2.1 Синтез магнитных наночастиц Fe ₃ O ₄ -ЛК.....	31
2.2 Изготовление кондуитов ПОБ и ПОБ/Fe ₃ O ₄ -ЛК методом ЭФ	31
2.3 Исследования материалов	32
2.4 Исследование пролиферации МСК на поверхности кондуитов.....	35
2.5 Исследование пролиферации SH-SY5Y на поверхности кондуитов	36
2.6 СЭМ клеток SH-SY5Y на поверхности кондуитов.....	36
3 Результаты и обсуждение	38
3.1 Исследование свойств магнетита Fe ₃ O ₄ -ЛК.....	38
3.2 Исследование свойств кондуитов ПОБ и ПОБ/Fe ₃ O ₄ -ЛК.....	39
3.2.1 Морфология кондуитов	39
3.2.2 Кристаллическая структура кондуитов.....	44
3.2.3 Химический состав поверхности магнитных частиц и кондуитов.....	46
3.2.4 Фазовый и химический состав кондуитов	48
3.2.5 Термический анализ кондуитов	50
3.2.6 Физико-механические свойства кондуитов	51
3.2.7 Магнитные свойства наночастиц Fe ₃ O ₄ -ЛК и кондуитов ПОБ/Fe ₃ O ₄ -ЛК	53
3.2.8 Смачиваемость поверхности кондуитов	55

3.3	Исследование биологических свойств кондуитов ПОб и ПОб/Fe ₃ O ₄ -ЛК	58
3.3.1	Оценка пролиферации МСК на кондуитах <i>in vitro</i>	58
3.3.2	Оценка пролиферации нейробластомы SH-SY5Y на кондуитах <i>in vitro</i>	62
4	Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	67
4.1	Предпроектный анализ	67
4.1.1	Потенциальные потребители результатов исследования	67
4.1.2	Анализ конкурентных технических решений	68
4.1.3	SWOT-анализ	69
4.2	Планирование научного исследования	71
4.2.1	Структура работ научного исследования	71
4.2.2	Определение продолжительности работ	72
4.2.3	Разработка графика проведения научного исследования	73
4.3	Формирование бюджета научного исследования	75
4.3.1	Расчет материальных затрат	75
4.3.2	Расчет затрат на специальное оборудование для научных работ	77
4.3.3	Расчет заработной платы	80
4.3.4	Расчет отчислений во внебюджетные фонды	81
4.3.5	Научные и производственные командировки	81
4.3.6	Стоимость контрагентных работ	82
4.3.7	Расчет накладных расходов	82
	Выводы по разделу	83
5	Социальная ответственность	86
5.1	Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности	87
5.2	Профессиональная социальная ответственность	89
5.2.1	Анализ вредных и опасных факторов	89
5.2.2	Электрический ток, вызываемый разницей электрических потенциалов	91
5.2.3	Электромагнитные и электростатические поля	92
5.2.4	Движущиеся машины и механизмы, подвижные части оборудования	93

5.2.5 Загрязнение воздушной среды в зоне дыхания	94
5.2.6 Чрезмерно высокая температура материальных объектов.....	95
5.2.7 Повышенный уровень шума и вибрации	96
5.2.8 Токсические химические вещества	97
5.2.9 Недостаток необходимого естественного и искусственного освещения.	98
5.2.10 Аномальные параметры микроклимата	99
5.2.11 Умственное перенапряжение, в том числе вызванное информационной нагрузкой.....	99
5.3 Экологическая безопасность.....	100
5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях.....	102
5.4.1 Анализ вероятных чрезвычайных ситуаций, которые может инициировать объект исследования	102
5.4.2 Обоснование мероприятий по предотвращению ЧС и разработка порядка действия в случае возникновения ЧС	103
Выводы по разделу	105
Заключение.....	107
Список публикаций обучающегося	109
Список использованных источников.....	111
Приложение А.....	121

Введение

Нервная система человека контролирует все органы и системы организма и включает в себя центральную нервную систему (ЦНС) и периферическую нервную систему (ПНС). Функцией ПНС является проводить сигнальные пути от ЦНС к отдельным органам. Центральные нервы надежно защищены костной тканью и гематоэнцефалическим барьером, в отличие от периферических нервов, которые подвержены повреждениям вследствие болезней, операций, аварий, войн, природных катаклизмов. В результате, повреждения периферических нервов могут привести к потере сенсорной и моторной функций вследствие низкой восстановительной способности зрелых нейронов [1-4]. Ежегодно регистрируется 300 000 случаев повреждений периферических нервов в Европе и 20 000 000 случаев в США [1, 4]. В России в проведении операций по поводу травм периферических нервов нуждается от 4 до 7 тысяч человек в год [5]. При этом около 45% повреждений нервов в России приходится на наиболее активную возрастную группу от 21 до 35 лет [5]. Подобные травмы в 65 % случаев приводят к длительной потере трудоспособности и инвалидности пострадавших.

Было замечено, что аксоны способны к самопроизвольной регенерации при незначительных повреждениях периферических нервов. Однако в случае серьезных повреждений свыше 1–2 см способность к самовосстановлению существенно снижена, что ведет к проблемам со здоровьем и трудоспособностью пациентов [2, 3].

В настоящий момент, рутинным клиническим подходом к восстановлению значительных нервных повреждений является аутотрансплантация донорского нерва. При этом иссекают здоровый донорский нерв пациента и трансплантируют его в область поврежденного нерва того же человека. Несмотря на то, что аутографты нервов считаются золотым стандартом терапии подобных травм, данный подход имеет ряд ограничений, среди которых нехватка донорских нервов, риск инфекций, возможность образования нейромы, необходимость повторных операций [3, 4]. Более того, аутотрансплантация нерва предполагает травмирование здорового донорского нерва, что может привести к потере двигательной и сенсорной функций травмированной области [1]. Таким образом, во всем мире существует потребность в эффективных стратегиях функционального восстановления поврежденных нервов без применения донорских нервов. Для преодоления существующих ограничений в лечении нервных травм требуются обширные исследования.

Эффективное применение синтетических биоматериалов может решить проблемы нехватки доноров и травматичности операций по аутотрансплантации. Материалы на основе биоразлагаемых полимеров исключают необходимость проведения повторных

операций [6-10]. В контексте реконструкции периферических нервов приобретают популярность полимерные кондуиты, которые представляют собой трубки с персонализированными геометрическими размерами и используются для соединения двух концов поврежденного нерва [1-3]. Главные функции кондуитов включают физическую защиту и механическую поддержку нерва, а также направление и стимуляцию восстановления нерва вдоль трубки.

Объектом данного исследования являются полимерные композитные магнитные кондуиты для инженерии нервной ткани.

Целью данной ВКР является получение и исследование физико-химических и биологических свойств кондуитов на основе биоразлагаемого поли-3-оксибутирата (ПОБ) и магнитных наночастиц (МНЧ). Для достижения поставленной цели будут выполнены следующие **задачи**:

- 1) оптимизация параметров электроформования (ЭФ) для получения магнитоактивных кондуитов с заданной структурой и физико-механическими свойствами;
- 2) комплексное исследование морфологии, топографии, кристаллической структуры, химического состава, физико-химических и магнитных свойств кондуитов;
- 3) исследование клеточной активности *in vitro* на поверхности полученных кондуитов.

Методы исследования. Для изучения физико-химических свойств материалов используются методы сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), атомной силовой микроскопии (АСМ), рентгенофазового анализа (РФА), рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС), спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), магнитометрия с вибрирующим образцом, физико-механические испытания на одноосное растяжение.

Практическая значимость результатов ВКР. Разработанные кондуиты станут перспективными кандидатами для дальнейших доклинических испытаний и практического клинического применения в восстановлении травм периферической нервной системы. Применение полученных материалов может предотвратить необратимую потерю двигательной и сенсорной функций в травмированной области, что улучшит качество жизни миллионов пациентов во всем мире. Предложенные кондуиты могут преодолеть недостатки, связанные с существующим общепринятым подходом к лечению повреждений ПНС.

Научная значимость результатов ВКР заключается в создании кондуитов нового улучшенного состава, а также в описании влияния МНЧ на топографию, кристаллическую структуру, физико-механические и магнитные свойства полимерных кондуитов. Помимо

этого, будет исследовано влияние внешнего низкочастотного магнитного поля (МП) на биологическую активность композитных магнитных кондуитов.

Обозначения и сокращения

ЦНС – центральная нервная система;
ПНС – периферическая нервная система;
ПОБ – поли-3-оксибутират;
МНЧ – магнитные наночастицы;
МП – магнитное поле;
ЭФ – электроформование
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;
АСМ – атомная силовая микроскопия;
РФА – рентгенофазовый анализ;
РФЭС – рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия;
КР – комбинационное рассеяние;
ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия;
ТИ – тканевая инженерия;
ПМК – полимолочная кислота;
ПГК – полигликолевая кислота;
ПКЛ – поли-ε-капролактон;
ПОА – полиоксиалканоаты;
ВКМ – внеклеточный матрикс;
ЭП – электрическое поле;
МСК – мезенхимальные стволовые клетки;
ВОГ – восстановленный оксид графена;
НСК – нервные стволовые клетки;
ЭМП – электромагнитное поле;
ПВДФ – поливинилиденфторид;
ПВДФ-ТрФЭ – поли (винилиденфторид-*co*-трифторэтилен);
ПОБВ – поли (оксибутират-*co*-валерат);
ПОБГ – поли (3-оксибутират-*co*-3-оксигексаноат);
ПОО – поли (3-оксиоктаноат);
ПОБВГ – поли (3-оксибутират-*co*-3-оксивалерат-*co*-3-оксигексаноат);
ГФР – глиальный фактор роста;

SFI – индекс функции седалищного нерва;
П-3ОБ-4ОБ – поли (3-оксибутират-*co*-4-оксибутират);
ЭМСК – эктомезенхимальные стволовые клетки;
ЛК – лимонная кислота;
 θ_s – статичный угол смачивания;
 θ_a – нарастающий угол смачивания;
 θ_r – убывающий угол смачивания;
 θ_h – гистерезис угла смачивания;
 σ – свободная поверхностная энергия;
ЭГ – этиленгликоль;
ОВРК – метод Оунса, Вендта, Рабеля и Къельбле;
 σ_{\max} – предел прочности при растяжении;
 δ – удлинение при разрыве;
 E – модуль Юнга;
ФБС – фетальная бычья сыворотка;
БФС – фосфатный солевой буфер;
ГМДС – гексаметилдисилазан;
 σ_s – намагниченность насыщения;
 σ_r – остаточная намагниченность;
 H_c – коэрцитивная сила;
НЦ – наноцеллюлоза;
ОГ – оксид графена;
ПЭГ – полиэтиленгликоль.

1 Обзор литературы

1.1 Общие требования к кондуитам для восстановления нервов

Для обеспечения максимального терапевтического эффекта кондуиты для восстановления нервов должны соответствовать ряду требований. Как любые материалы для тканевой инженерии (ТИ) кондуиты должны быть биосовместимы с окружающими клетками и тканями, чтобы исключить любые мутагенные, канцерогенные и цитотоксичные процессы. Также кондуиты не должны вызывать воспалительных реакций со стороны иммунной системы. Поскольку неподходящий размер аутографта является глобальной проблемой аутотрансплантации [1-3], синтетический кондуит должен быть изготовлен по заданным, идеально подходящим геометрическим параметрам.

Морфологическая структура играет важную роль в успешном восстановлении нервных дефектов. Для поддержания клеточного роста и дифференцировки кондуиты для регенерации нервной ткани должны имитировать структуру и топографию внеклеточного матрикса (ВКМ) нервной ткани. Для обеспечения транспорта нутриентов, метаболитов и газов из окружающей среды внутрь кондуита и в обратном направлении необходима проницаемая пористая структура стенки кондуита. Сообщающиеся поры способствуют трехмерному распространению клеток. В дополнение, высокое значение площади поверхности повышает клеточную адгезию [11].

Преимущественная ориентация волокон вдоль кондуита является одним из ключевых параметров для инженерии нервной ткани. Клетки на поверхности ориентированных волокон вытягиваются вдоль направления волокон, тем самым приобретая удлиненную морфологию, присущую здоровым нервным клеткам. Таким образом, волокна выступают в роли трафарета для удлинения нейритов нервных клеток [12-18]. Было показано, что длина нейритов на выровненных микроволокнах выше по сравнению с длиной нейритов на случайно ориентированных волокнах [17]. В работе [18] сообщается, что кондуиты с ориентированной структурой способствуют большему удлинению аксонов $D\beta N^+$ и отростков $GFAP^+$ в сравнении с неориентированными кондуитами. В свою очередь, в исследовании [15] показана улучшенная пролиферация нейроноподобных клеток крысы B65 на выровненных электроформованных скэффолдах по сравнению со случайно ориентированными скэффолдами. Кроме того, ориентированные волокна более благоприятны для адгезии, выживания и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) по сравнению со случайно ориентированными волокнами [19]. Таким образом, топографические сигналы ориентированных волокон повышают клеточную активность и, тем самым стимулируют восстановление нервной ткани.

Физико-механические свойства играют ключевую роль в восстановлении нервных повреждений. Механические функции кондуитов включают создание защитного барьера для новых аксонов; предотвращение давления окружающих тканей на восстановленные клетки; обеспечение стабильного поддержания на протяжении всего процесса реконструкции нерва [8, 20]. Для создания кондуитов с необходимой прочностью и гибкостью необходимо оценить механические свойства целевых тканей и подобрать подходящий материал. Механические характеристики нервной ткани подробно рассмотрены в соответствующем подразделе.

Для предотвращения повторных операций по извлечению имплантата необходима способность кондуитов к биодegradации в физиологических средах. После имплантации кондуит покрывается и, деградируя, перестраивается нервными клетками, в результате чего полностью замещается нервной тканью с восстановленными функциями [11]. При этом скорость биодegradации должна учитывать длительность восстановления нервной ткани, т.е. от нескольких месяцев до нескольких лет, поэтому для данного применения перспективны медленно разлагающиеся материалы.

В ряде работ для получения кондуитов используются природные полимеры (коллаген [21], желатин [22, 23], хитозан [24], гиалурон), однако их слабые механические характеристики и высокая скорость дegradации ограничивают их применение [8]. Наибольшее распространение получили синтетические полимеры: поли-L-молочная кислота (ПМК) [10, 25-27], полигликолевая кислота (ПГК) и их сополимеры [7], поли-ε-капролактон (ПКЛ) [8, 20], полиоксиалканоаты (ПОА) [11, 28]. Эти разработки достигли определенных успехов с точки зрения биосовместимости, скорости дegradации и подходящих физико-механических характеристик, поэтому кондуиты на основе перечисленных полимеров решают задачу механической поддержки и защиты нервов. Однако данные материалы в чистом виде биоинертны и не выполняют важнейшую функцию стимуляции восстановления нервной ткани. Важной задачей биоматериаловедения остается создание биоактивных кондуитов с необходимыми топографическими, биохимическими и физическими стимулами для активации процесса роста ткани. Перспективным решением указанной проблемы является применение магнитных [8, 10, 23-25] и электроактивных материалов [9, 29, 30].

1.2 Методы получения кондуитов для инженерии нервной ткани

За последние годы было предложено множество методов изготовления кондуитов для восстановления нервной ткани, среди которых солевое выщелачивание, лиофильная сушка, самосборка, литье полимерного раствора, вспенивание газа, 3D-печать и, наконец, ЭФ [12]. Большинство из предложенных методик имеет недостатки, ограничивающие их применение в инженерии нервной ткани. Например, метод самосборки не позволяет точно контролировать измерения волокон; к недостаткам газового вспенивания и лиофильной сушки можно отнести слабую взаимосвязь пор и мелкие нерегулярные поры [3]. Низкая механическая прочность ограничивает применение 3D-печатных скэффолдов [31].

В рамках данной ВКР мы сосредоточились на методе ЭФ, который является универсальной, простой и экономически выгодной технологией получения скэффолдов и кондуитов с контролируемым диаметром и направлением волокон, пористостью, кристалличностью и физико-механическими свойствами. Указанные свойства волокон можно варьировать, изменяя параметры раствора, процесса и микроклимата в ходе ЭФ [1, 31]. Данный метод позволяет получать трехмерные структуры, которые успешно имитируют природный ВКМ. Высокая пористость, гибкость и развитая удельная поверхность электроформованных материалов усиливают взаимодействие между клетками и полимерным матриксом.

1.3 Пьезоэлектрическая стимуляция восстановления нервной ткани

В ТИ применяются различные стимулы, среди которых электрическая стимуляция более эффективна для мягких тканей, таких как кожа, сердечная и нервная ткани. Электрическая стимуляция обеспечивает благоприятную биоэлектрическую среду [2, 18, 29, 32], что особенно актуально для нервной системы. Очевидно, что при повреждении нерва передача электрических сигналов прекращается [33]. Применение электроактивных материалов помогает сохранить проводимость электрического сигнала, которая жизненно важна для нервной системы. Недавно исследователи обнаружили, что электрическая стимуляция с различными частотами может усиливать рост аксонов в электроактивных тканях, таких как нервы, и тем самым способствовать регенерации нервов. Посредством передачи биологического сигнала электрические стимулы могут направлять рост аксонов вдоль нервного дефекта от проксимального конца повреждения к дистальному. Было показано, что электрическое напряжение 50 мВ/мм усиливает рост нейритов шванновских клеток и ориентирует их в направлении электрического поля (ЭП) [34]. Более того, применение слабых ЭП постоянного тока может усиливать регенерацию аксонов и удлинение нейритов спинального ганглия [35, 36] Регенерация периферических нервов со

значительными дефектами стала возможной благодаря электрической стимуляции [18, 30, 33, 37-39]. Также было доказано, что электрическая стимуляция способствует нейронной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [40, 41].

Причиной успешной электрической стимуляции регенерации нервов являются врожденные электрические свойства нервных клеток. Мембрана нервных клеток заряжена отрицательно изнутри и положительно снаружи. Следовательно, даже при отсутствии нейтрального пропускания в мембране нервной клетки существует потенциал покоя порядка -70 мВ [2]. Главной функцией потенциала покоя является транспорт ионов натрия и калия через мембрану нервного волокна и калиевые каналы, соответственно. Электрическая активность нервных клеток возникает за счет потенциала действия, который представляет собой беспорядочное повышение потенциала покоя в ответ на внешние электрические импульсы. Благодаря этим потенциалам и миграции ионов существует возможность контролировать поведение клеток с помощью электрической стимуляции. Использование правильных моделей стимуляции может направлять рост и регенерацию нервных клеток [42].

Физиологические ЭП стимулируют клеточную активность, а именно миграцию, дифференцировку и пролиферацию [2]. ЭП улучшают процесс заживления, нервно-мышечную деятельность, неврологические и психические расстройства, сохраняя нормальное состояние тканей. Генерация ЭП на клеточной мембране влияет на работу ионных каналов и рецепторов, что улучшает проводимость внутриклеточных сигнальных молекул и, следовательно, миграцию, рост, пролиферацию и дифференцировку клеток [2]. Электрическая стимуляция поляризует сигнальные ингредиенты, и тем самым направляет движение клеток в ЭП [43].

Электрические и электромагнитные поля (ЭМП) могут также усиливать активность нервных стволовых клеток (НСК) [44]. ЭП увеличивает популяцию нейронов и дифференцировку НСК в нейроны с удлинёнными нейритами [44]. ЭМП улучшает рост аксонов, направляет движение клеток, способствует нейрогенезу и ускоряет дифференцировку НСК в функциональные нейроны. Было показано, что электрические стимулы регулируют расположение рецепторов клеточной поверхности и адсорбцию белков, что способствует реорганизации цитоскелета, вызывая изменения морфологии клеток.

Как правило, электрические сигналы подаются через проводящий скэффолд и внешнее питание инвазивным способом [45]. Поэтому электрическая стимуляция обычно требует использования вспомогательных устройств, таких как электроды и генераторы ЭП. Данный подход имеет ряд недостатков, а именно необходимость сложной и габаритной

системы с внешним источником питания [46], воспаление и глиоз, вызванные имплантированными электродами [47], и наконец, необходимость повторной операции по извлечению электродов. Более того, энергоёмкость батарей ограничена, что затрудняет длительное использование подобных нейростимуляторов [48]. Поэтому для эффективного лечения нервных дефектов необходимо создание беспроводных автономных устройств. В отличие от традиционной электростимуляции применение пьезоэлектрических полимеров может вызывать изменение поверхностного заряда без внешних источников энергии или электродов [30, 39, 41, 49]. Пьезоэлектрические полимеры способны генерировать электричество в ответ на механическую деформацию (прямой пьезоэффект) и наоборот (обратный пьезоэффект).

In vivo электростимуляция посредством пьезоэлектрических материалов может запускаться макро движениями тела, изменениями позы или циркуляцией интерстициальной жидкости [39]. *In vitro* необходимая механическая деформация может достигаться за счет прикрепления и миграции клеток и тканей [17]. Было установлено, что клетки оказывают давление на скэффолд с силой порядка 0,1–10 нН [50, 51]. В работе [50] путем приложения силы к поверхности пьезоэлектрических нанополосок на основе поливинилиденфторида (ПВДФ) был смоделирован пьезоэлектрический потенциал, генерируемый движением клеток. В результате нанополоска из ПВДФ генерировала пьезоэлектрический потенциал от 34 мкВ до 3,4 мВ при увеличении силы давления клеток от 0,1 до 10 нН. С помощью флуоресцентной микроскопии авторы работы [51] наблюдали деформацию пьезоэлектрических нановолокон под действием клеток *in situ*. На покадровой конфокальной визуализации была видна миграция клеток и смещение нановолокон. За 108 минут съемки нановолокна ПВДФ деформировались на 5–60 мкм в течение [51].

Для инициации пьезоэлектрического эффекта, помимо упомянутых естественных путей, могут использоваться альтернативные методы, такие как неинвазивный ультразвук [38, 48, 52] или магнитное поле [53].

Предшествующие исследования показали, что пьезоэлектрические скэффолды поддерживают адгезию, рост, дифференцировку и миелинизацию шванновских клеток, а также удлинение нейритов [14, 29, 30, 54]. Кроме того, пьезоэлектрические композитные скэффолды способствовали пролиферации и дифференцировке клеток PC12 [55-57]. В дополнение, пьезополимерные матриксы могут специфически усиливать нейроноподобную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (МСК), о чем свидетельствует экспрессия продуцентов нейронов и нейроглиоцитов и *Tuj1*, а также длина нейритов [50, 51, 58]. Также было показано, что пьезополимерные композитные пленки с добавлением пьезокерамики под действием ультразвука улучшают жизнеспособность и

дифференцировку клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, способствуя миграции ионов кальция [59]. Что касается *in vivo* исследований, пьезоэлектрические кондуиты на основе ПВДФ использовали для восстановления иссеченных седалищных нервов мышей [37]. Гистологический анализ позволил установить, что нервы, восстановленные в электроактивных кондуитах, содержали значительно больше миелинизированных аксонов, чем в контрольных образцах. Аналогичный результат был получен с использованием пьезоэлектрических кондуитов из сополимера поли(винилиденфторид-*co*-трифторэтилена) (ПВДФ-ТрФЭ) для восстановления дефектов седалищных нервов крыс [60]. В исследовании [30] скэффолды на основе ПВДФ продемонстрировали способность к восстановлению электрофизиологии, морфологии и функций нервов, которая сравнима с аутоотрансплантацией.

Механизмы стимуляции восстановления нервной ткани посредством пьезополимерных скэффолдов довольно сложны и могут включать несколько аспектов. Интересно, что многие внеклеточные и цитоплазматические биополимеры, в том числе хорошо известные полипептиды (например, коллаген и многие ферменты) и полинуклеотиды (например, РНК и ДНК), обладают пьезоэлектрическими свойствами или способностью накапливать заряд [60]. Эти свойства играют важную роль в росте и ремоделировании тканей за счет комбинации электрических, механических и химических процессов. Предполагается, что главная функция пьезоэлектричества этих биополимеров состоит в изменении их конформации или ориентации за счет механизмов электроконформационной связи, что приводит к усилению ферментативных реакций. Также возможно, что пьезоэлектрическая природа биополимеров отвечает за увеличение синтеза и секреции молекул ВКМ, которые могут управлять ростом нейритов. Более того, предполагается, что нейриты могут выступать в роли электрочувствительных датчиков, которые передают сигналы роста в ядра нервных клеток. Электроактивность пьезоэлектрических полимеров может дополнять электрическую среду, характерную нервной системе. Кроме того, пьезополимерные субстраты могут адсорбировать положительные заряды и важные молекулы ВКМ [61], что также может способствовать регенерации нейронов. Авторы работы [30] предположили, что ускоренное восстановление нервов *in vivo* под действием пьезоэлектрических кондуитов связано с (1) усиленной миграцией, пролиферацией и дифференцировкой шванновских клеток в пьезополимерном кондуите; (2) секреции факторов роста нервов; (3) усиленным ангиогенезом.

В работе [58] описана нейральная дифференцировка стволовых клеток на мембранах FeOON/ПВДФ под действием ультразвука. Авторы предположили, что электрические сигналы, исходящие от мембраны, могут передаваться во внутриклеточную среду

посредством прямого контакта между материалом и клетками. Эти сигналы могут способствовать экспрессии генов, которые регулируют нейральную дифференцировку стволовых клеток [58]. Аналогично, в исследовании [62] изучен молекулярный механизм дифференцировки нейроноподобных клеток PC12 под действием пьезоэлектрической стимуляции. Установлено, что электрическая поляризация пленки на основе ПВДФ вызывает реполяризацию клеточной мембраны, что приводит к усилению притока ионов кальция.

1.4 Полиоксиалканоаты и их модификации для инженерии нервной ткани

Полиоксиалканоаты (ПОА) являются перспективными материалами для инженерии нервной ткани благодаря своему природному происхождению, медленной скорости резорбции без токсичных продуктов распада и механической стабильности [11, 15, 63, 64]. Известно, что ПОА обладают нейрорегенеративными свойствами [11]. Относительно низкая скорость деградации ПОА в организме (по сравнению, например, с широко используемыми полигликолевой и полимолочной кислотами) соответствует медленной регенерации нервной ткани [65, 66]. Наиболее коммерчески доступный, хорошо изученный и широко используемый поли-3-оксибутират (ПОБ) представляет собой пьезоэлектрический биосовместимый полиэфир, который синтезируется в прокариотических клетках бактерий. Продукт деградации ПОБ – D-3-гидроксимасляная кислота – является составляющим крови человека, который нетоксичен для организма и не вызывает воспалительных реакций [67]. Однако ПОБ по своей природе является хрупким и жестким материалом, что не удовлетворяет требованиям инженерии нервной ткани [68, 69]. Решением данной проблемы является смешение ПОБ с другими полимерами (ПКЛ, хитозаном, другими ПОА) [11, 15, 66, 70] или использование сополимеров, например, поли (3-оксибутират-*co*-4-оксибутирата) [66], поли (3-оксибутират-*co*-3-оксигексаноата) (ПОБГ) [63, 65] и поли (оксибутират-*co*-валерата) (ПОБВ) [16, 28, 69, 71]. Например, было показано, что добавление ПКЛ улучшает свойства ПОБ при изгибе и растяжении [66]. В работе [65] исследован сополимер ПОБГ для возможного применения в восстановлении поврежденных нервов: пористые кондуиты были изготовлены методом выщелачивания частиц и использованы для регенерации 10-миллиметровых дефектов седалищного нерва крыс Sprague-Dawley. Механические испытания показали, что кондуиты ПОБГ обладают подходящими механическими свойствами с предельной прочностью от 0,94 до 2,3 МПа. Помимо этого, была показана проницаемость данных кондуитов для питательных веществ, а именно глюкозы, лизоцима и бычьего сывороточного альбумина. Электромиографическое исследование (электрическое исследование мышечной функции)

после 1 месяца имплантации кондуитов ПОБГ выявило быстрое функциональное восстановление поврежденных нервов. На гистологических срезах показана способность кондуитов препятствовать прорастанию соединительной ткани. Наконец, гравиметрия кондуитов ПОБГ после 3 месяцев биодеградации *in vivo* показала снижение массы образцов на 20–24 %.

Скэффолды на основе ПОБВ также демонстрируют растущий потенциал для использования в инженерии нервной ткани, в частности, в качестве субстрата для культуры шванновских клеток [68, 69, 71]. В поисках наилучшей морфологии субстратов для нервной ткани Суатон и др. [68] сравнили электроформованные микроволоконные скэффолды на основе ПОА с пленками ПОА, отлитыми из растворителя, с точки зрения механических свойств, а также прикрепления и пролиферации шванновских клеток *in vitro*. Механические испытания на растяжение подтвердили, что матриксы из волокон ПОБВ были более гибкими, чем матриксы на основе гомополимера ПОБ. В то же время, механическая прочность литых пленок значительно превышала прочность электроформованных скэффолдов. Интересно, что шванновские клетки намного лучше прикреплялись и пролиферировали на плоской гладкой поверхностях пленок, чем на шероховатой поверхности волокнистых скэффолдов, при этом жизнеспособность клеток на пленке ПОБВ на 5-е сутки была наибольшей среди всех исследованных образцов. Это наблюдение авторы связали с более гидрофильной поверхностью пленок по сравнению с волокнистыми каркасами.

В работе [11] были изготовлены электроформованные скэффолды из смеси ПОБ и поли (3-оксиоктаноата) (ПОО) в соотношении 25:75 с диаметрами волокон $2,4 \pm 0,3$, $3,7 \pm 0,3$ и $13,5 \pm 2,3$ мкм. Миграция клеток, наблюдаемая на выровненных волокнах, показала топографическую направленность в соответствии с направлением волокон. Культивирование нейронных клеток (как по отдельности, так и в сокультуре с шванновскими клетками) показало, что все группы волокон ПОА способны поддерживать пролиферацию и дифференцировку нейронных клеток. Следует отметить, что выровненные каркасы с большим диаметром волокон ($13,50 \pm 2,33$ мкм) продемонстрировали наилучшие показатели роста и дифференцировки нейритов по сравнению с волокнами $2,4 \pm 0,3$ и $3,7 \pm 0,3$ мкм.

В свою очередь, в исследовании [66] сравнили кондуиты на основе бленда ПОБ/ПКЛ и сополимера поли (3-оксибутират-*co*-4-оксибутирата) (П-3ОБ-4ОБ). Была проведена гидролитическая деградация кондуитов *in vitro* и исследованы их механические свойства в ходе деградации. В течение 16 недель наблюдалось ожидаемое снижение предельной нагрузки и удлинения при растяжении. При этом кондуит ПОБ/ПКЛ оказался более

стабильными в сравнении с кондуитом П-3ОБ-4ОБ. Поскольку сополимер П-3ОБ-4ОБ разлагается быстрее, его следует рассматривать для краткосрочных регенеративных применений. Исследования *in vitro* показали, что полученные кондуиты на основе ПОА поддерживают выживание нейронов и рост нейритов.

Гидрофобность ПОБ является еще одним недостатком, ограничивающим его биомедицинское применение; поэтому для изготовления субстратов для тканевой инженерии нежелательно использовать его в чистом виде. Добавление к ПОБ природных полимеров стало эффективным способом придания гидрофильности ПОБ [15, 16, 69, 70]. Для этой цели широкое распространение приобрел хитозан – природный полимер, получаемый из клеточной стенки грибов и микроорганизмов [15, 70, 72]. Физико-химические свойства, биоразлагаемость, биосовместимость, хорошая клеточная адгезия и гидрофильность хитозана сделали его перспективным материалом для использования в тканевой инженерии. Например, в исследованиях [15, 70] представили электроформованные скэффолды с ориентированными нановолокнами на основе ПОБ и хитозана. Добавление 20 мас. % хитозана к ПОБ уменьшило угол смачивания скэффолдов от 111° до 33°. Важно отметить, что высоко ориентированные волокна значительно более гидрофильны в сравнении со случайно ориентированными волокнами аналогичного состава. Исследование гидролитической дегградации *in vitro* ориентированных скэффолдов показало, что за 8 недель образцы ПОБ, ПОБ/хитозан 85:15 и ПОБ/хитозан 80:20 потеряли 20%, 25% и 35% от исходной массы, соответственно. Таким образом, скорость биодегградации скэффолдов увеличивалась с увеличением содержания хитозана благодаря его высокой биоразлагаемости. Результаты анализа МТТ продемонстрировали улучшенную пролиферацию нейроноподобных клеток крысы В65 на ориентированных волокнах ПОБ/хитозан по сравнению со случайно расположенными волокнами. СЭМ показала, что биполярные отростки нейритов и ориентация нервных клеток были выровнены в направлении волокон.

Альтернативным природным полимером для комбинирования с ПОА является коллаген – основной элемент природного ВКМ. Масаэли и др. [69] изготовили электроформованные скэффолды для регенерации нейронов на основе ПОБ и ПОБВ с добавлением коллагена I типа. ДСК показала, что увеличение содержания ПОБВ в нановолоконных композитных скэффолдах снижает температуры плавления и стеклования, а также степень кристалличности скэффолдов. Шванновские клетки прикреплялись и пролиферировали на данных скэффолдах в течение 14 дней, независимо от ориентации или состава волокон. При этом шванновские клетки, растущие на ориентированных волокнах ПОБ/ПОБВ/коллаген, демонстрировали биполярную морфологию, ориентированную вдоль

направления волокна, в то время как клетки, растущие на случайно расположенных волокнах, проявляли мультиполярную морфологию. Важно отметить, что включение коллагена в нановолокна увеличивало пролиферацию шванновских клеток на 14-й день, экспрессию гена GDNF на 7-й день и секрецию фактора роста нервов на 6-й день. Эти результаты подтверждают, что наличие коллагена I типа в нановолокнах усиливает дифференцировку клеток. Дальнейшие исследования этого же коллектива были сосредоточены на функционализации поверхности электроформованных скэффолдов для нервной ткани ПОБ/ПОБВ с помощью синтетически полученных пептидов [71]. Успешная химическая иммобилизация пептидов на поверхность нановолокнистых скэффолдов была подтверждена на основании пика N 1s в спектрах РФЭС. СЭМ-изображения шванновских клеток на матриксах выявили ориентацию клеток вдоль волокон, что соответствует морфологии клеток в нативных тканях. Было показано, что шванновские клетки могут прикрепляться, мигрировать и удлиняться как на необработанных, так и на модифицированных скэффолдах ПОА. При этом более высокая пролиферация и метаболическая активность клеток наблюдалась в случае нановолокон ПОБ/ПОБВ, модифицированных биомолекулами.

Аналогично, в исследовании [16] была проведена оценка пролиферации клеток PC12 и удлинение нейритов на электроформованных нановолоконных матриксах ПОБВ/коллаген (50:50). Результаты показали значительное усиление пролиферации и дифференцировки клеток на скэффолдах ПОБВ/коллаген по сравнению с чистым скэффолдом ПОБВ. При этом добавление 50 мас. % коллагена приводило к снижению механических характеристик матриксов на основе ПОБВ. В свою очередь, исследование [73] подтверждает повышенную адгезию шванновских клеток на волокнах ПОБ с ковалентно пришитым коллагеном за счет улучшенной гидрофильности и биосовместимости.

В статье [63] поверхность пленок на основе различных сополимеров ПОА была покрыта гибридными белками для стимуляции адгезии, пролиферации и нейронной дифференцировки НСК крысы. Среди анализируемых образцов, наилучшая адгезия и пролиферация НСК была достигнута на пленке из поли (3-оксибутират-*co*-3-оксивалерат-*co*-3-оксигексаноата) (ПОБВГ), покрытой белком. Эффективность и низкая стоимость получения гибридных белков делают их перспективным покрытием гидрофобных биоматериалов для применения инженерии нервной ткани.

Помимо этого, регенерацию нервной ткани с помощью кондуитов можно ускорить, изменяя локальную микросреду с помощью нейронных факторов роста [64, 74]. Глиальный фактор роста (ГФР) является трофическим фактором, специфичным для шванновских клеток, которые играют ключевую роль в восстановлении аксонов после повреждения.

Моханна и др. [64] использовали композитный кондуит ПОБ, модифицированный ГФР, для реконструкции дефектов в малоберцовом нерве кролика. Кондуит ПОБ-ГФР способствовал регенерации нервов в течение 63 дней после имплантации, что привело к реиннервации двигательных органов. Спустя 120 дней после операции добавление ГФР значительно увеличило количество шванновских клеток и регенерацию аксонов по сравнению с контрольными кондуитами ПОБ. Кроме того, в кондуите ПОБ-ГФР было обнаружено больше миелиновых волокон по сравнению с контролем. Наконец, ПОБ-ГФР значительно снижал потерю мышечной массы по сравнению с контролем.

Комбинация биоматериалов с шванновскими клетками является еще одной стратегией придания биоактивности ПОА. Новикова и соавторы [75] оценили восстановление аксонов после повреждения спинного мозга крыс с помощью кондуита ПОБ, засеянного шванновскими клетками. Результаты *in vivo* показали, что кондуит на основе ПОБ, засеянный шванновскими клетками, обеспечивает выраженную регенерацию аксонов внутри имплантата. Кроме того, данное исследование показало, что модификация кондуита ПОБ молекулами ВКМ (фибронектином, ламинином и коллагеном) значительно повышает выживаемость шванновских клеток. Аналогично, в исследовании [76] сообщается, что покрытие кондуитов ПОБ молекулами ВКМ усиливает пролиферацию шванновских клеток в ряду ламинин > фибронектин > коллаген. Таким образом, белки ВКМ, особенно ламинин, важны для регенерации сенсорных нейронов, [66]. Волокна, покрытые ламинином и коллагеном, могут выполнять функции эндоневрий, который состоит из различных внеклеточных белков и поддерживает шванновские и нейрональные клетки [66].

Клиническое использование эндогенных шванновских клеток ограничено, так как повреждения нервов требуют немедленного хирургического лечения, а необходимое количество клеток не всегда доступно. Для решения этой проблемы исследуется способность различных типов стволовых клеток дифференцироваться в шванновские клетки [28, 72, 77]. В работе [28] в нановолокнистый кондуит на основе ПОБВ добавили МСК, дифференцированные в нейроны, для реконструкции иссеченных седалищных нервов крысы *in vivo*. Исследование пролиферации МСК на нановолокнистых кондуитах подтвердило хорошую биосовместимость ПОБВ с клетками. При этом установлено, что ориентированные волокна более благоприятны для адгезии, выживания и пролиферации МСК по сравнению со случайно расположенными волокнами. Гистологическое исследование и анализ восстановления двигательной функции показали, что данный кондуит способствовал регенерации нервов, нейрогенезу и восстановлению двигательной функции с высоким значением индекса функции седалищного нерва (SFI) $-34,7 \pm 1,2$ на 10-

й неделе после операции. В свою очередь, Озер и коллеги [72] оценили эффективность посева МСК костного мозга человека на кондуиты ПОБ, покрытые хитозаном, для восстановления повреждения седалищного нерва длиной 10 мм. Гистологическое исследование показало, что оба типа кондуитов (как с добавлением МСК, так и без них) поддерживали регенерацию аксонов. Однако кондуиты, засеянные МСК, продемонстрировали большую способность к восстановлению нервов в сравнении с контрольными кондуитами ПОБ, но были менее эффективны, чем нервные аутографты.

В поисках наилучшей формы субстрата для направления роста нервов были получены трубчатый конduit и плоская полоска на основе ПОБ [78]. Авторы работы предположили, что преимуществами простой полоски над трубчатой структурой являются простота изготовления и применения, гибкость, а также меньшее количество имплантируемого инородного материала. Как полоску ПОБ, так и конduit засеяли шванновскими клетками для придания биоактивности и использовали для перекрытия дефекта седалищного нерва крыс. Полоски ПОБ успешно поддерживали прорастание аксонов, сохраняя при этом механическую стабильность и первоначальное местоположение в животных. Через 2 недели образцы нервов собирали и исследовали на наличие маркеров аксонов и шванновских клеток. Иммуногистохимия выявила большую степень восстановления нерва и большее число шванновских клеток в группе полосок ПОБ в сравнении с группой кондуитов ПОБ, что было связано с активной васкуляризацией открытой конструкции. Таким образом, установлено, что на начальной стадии восстановления нерва конduit менее эффективен ввиду травматичной имплантации с большим количеством швов, а также возможного смещения кондуита. Однако в долгосрочной перспективе новому нерву необходима защитная среда, которую может обеспечить трубчатая структура. Поэтому необходима оценка более длительного периода поле имплантации, чем 2 недели, чтобы найти оптимальную конфигурацию.

Многие другие исследования демонстрируют положительные результаты использования кондуитов на основе ПОБ для регенерации периферических нервов *in vivo* [79-82]. На основании изученной литературы данный полимер был выбран в рамках ВКР в качестве материала для изготовления кондуитов для восстановления нервной ткани.

1.5 Магнитоактивные материалы для инженерии нервной ткани

В предыдущем подразделе подробно рассмотрены биологические и химические модификации для создания биоактивных материалов на основе ПОА. Альтернативной стратегией физической природы для стимуляции восстановления нервной ткани является внедрение МНЧ в полимерную матрицу с последующим приложением внешнего МП. Такой подход обеспечивает более сильные и контролируемые воздействия на нейроны на клеточном уровне, при этом МНЧ намагничиваются во внешнем МП и создают механическое напряжение на органеллах и клеточной мембране [8, 24, 25]. Для придания биоматериалам магнитных свойств в качестве наполнителей широко используются наночастицы магнетита (Fe_3O_4) благодаря их высоким значениям намагниченности, биосовместимости, уникальным физико-химическим свойствам и химической стабильности в физиологических средах. Магнитные композитные скэффолды были исследованы для инженерии нервной ткани [8, 10, 23-25]. Например, в исследовании [8] был изготовлен композитный конduit на основе ПКЛ с добавлением наночастиц магнетита и мелатонина, который обеспечивает благоприятную микросреду для нервной регенерации. Было показано, что данный конduit обладает достаточной механической прочностью и биосовместимостью *in vitro*, а также обеспечивает восстановление морфологии, функций и электрофизиологии седалищного нерва *in vivo*. Кроме того, было показано, что применение композитных волокон с магнетитом в переменном МП обеспечивает на 30 % большую длину и на 62 % большую площадь нейритов в сравнении с чистыми волокнами из ПМК [25]. Джонсон и др. изготовили магнитоактивные кондуиты на основе ПМК, которые вносили в коллагеновый гидрогель, и регулировали их положение в гидрогеле с помощью внешнего магнита [10]. Авторы обнаружили, что наночастицы магнетита, покрытые олеиновой кислотой, значительно повышают рост нейритов и поверхностную нанотопографию электроформованных волокон. Помимо этого, удлинение нейритов на кондуитах в гидрогеле в 1,4–3 раза превышало удлинение нейритов в контрольном гидрогеле без кондуитов. Аналогично, в работе [23] электроформованные желатиновые волокна с добавлением МНЧ были внедрены в альгинатный гидрогель и показано, что скорость пролиферации эктомезенхимальных стволовых клеток (ЭМСК) в гидрогеле с магнитоактивным нанокомпозитом увеличивается по сравнению с контрольным гидрогелем. Помимо этого, добавление наночастиц магнетита ускоряет нейронную дифференцировку ЭМСК.

Коллоидная стабильность МНЧ играет важную роль для их биомедицинского применения [83]. Непокрытые МНЧ склонны к агрегации, поэтому для повышения их стабильности необходима функционализация поверхностно-активным веществом. Отрицательно заряженные частицы, функционализированные лимонной кислотой (ЛК), более стабильны в водных системах [84]. ЛК содержит три карбоксильные группы –COOH, за счет которых легко адсорбируется на поверхности МНЧ. Одна или две карбоксильные группы молекулы ЛК могут хемосорбироваться, оставляя на поверхности частиц хотя бы одну свободную карбоксильную группу. В результате, поверхность частиц становится гидрофильной, и агрегация частиц предотвращается [85].

На основании изученной литературы мы предполагаем, что кондуиты на основе биоразлагаемого пьезоэлектрического ПОБ и наночастиц магнетита, модифицированных ЛК, являются перспективным кандидатом для регенеративной медицины нервной системы.

2 Материалы и методы

2.1 Синтез магнитных наночастиц Fe₃O₄-ЛК

Наночастицы магнетита, покрытые ЛК, были синтезированы методом химического соосаждения солей железа (II) и (III), как описано ранее [86] с незначительными модификациями. Синтез проводился в инертной среде азота. 0,915 г FeSO₄·7H₂O и 2,49 г FeCl₃·6H₂O растворили в 350 мл деионизированной воды. Раствор нагревали до 80 °С с интенсивным перемешиванием 1300 об./мин. Затем в раствор быстро внесли 10 мл NH₄OH (25 мас. %). Полученную смесь выдержали 5 минут при интенсивном перемешивании. После этого, в суспензию добавили 1 мл ЛК. Спустя 90 минут смолоподобный черный магнитный гель промывали несколько раз деионизированной водой, осаждая его магнитом. Затем гель несколько раз промывали этиловым спиртом, чтобы вымыть оставшуюся ЛК. В конце, МНЧ промыли несколько раз ацетоном и оставили в ацетоновой суспензии (15 мл) для дальнейшего использования при ЭФ.

2.2 Изготовление кондуитов ПОБ и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК методом ЭФ

ПОБ природного происхождения был получен с помощью бактерий штамма *Azotobacter chroococcum* 7B, как описано в статьях [87, 88]. Для синтеза чистых кондуитов (ПОБ) 0,2575 г гранул ПОБ растворили при медленном перемешивании в 3,2 мл хлороформа (CHCl₃, Sigma-Aldrich). Для повышения полярности раствора добавили 0,8 мл ацетона. В результате получился 4,5 мас. %-ный раствор ПОБ в смеси хлороформ/ацетон (80:20 об./об.). В случае композитного кондуита ПОБ/Fe₃O₄-ЛК 0,2575 г ПОБ растворяли в 3,2 мл хлороформа, после чего последовательно добавили 0,4 мл ацетона и 0,4 мл ацетоновой суспензии МНЧ, чтобы получить раствор с концентрацией МНЧ 8 % от массы ПОБ. После тщательной гомогенизации, раствор залили в 5 мл шприц, который соединили с насосом и магистралью, соединенной с иглой калибра G27 (Fisnar, США). Коллектор представляет собой стальную спицу с диаметром 2 мм. При ЭФ использовались напряжение 12 кВ, время синтеза 40 мин, расстояние от иглы до коллектора 20 см с постоянной скоростью подачи 0,23 мл/ч и скоростью вращения коллектора 765 об./мин.

Для методов анализа, в которых необходима плоская ровная поверхность (гониометрия статичной капли, РФА и РФЭС), были изготовлены скэффолды с идентичной структурой волокон, как в кондуитах. Для АСМ были получены одиночные волокна ПОБ и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК на проводящих стеклах. В данном случае ЭФ проводили в течение 3-х минут с описанными выше параметрами.

2.3 Исследования материалов

Морфология полученных наночастиц Fe_3O_4 -ЛК и кондуитов ПОБ и ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК исследовалась методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, Quanta 600, Thermo Fisher, Япония). Средние диаметры МНЧ и волокон были рассчитаны из 100 измерений с 5 изображений СЭМ с использованием программы ImageJ (НИН, США) и представлены со стандартными отклонениями ($\pm\text{SD}$).

Пористость кондуитов была рассчитана на основании гравиметрического метода, описанного ранее [89, 90]. Толщина стенки кондуитов была измерена в ImageJ по оптическим фотографиям сечения кондуитов (Рисунок 3.2). При расчете пористости использовалась формула (1):

$$\text{Пористость (\%)} = \left(1 - \frac{\rho_{\text{кондуита}} (\text{г см}^{-3})}{\rho_{\text{объема}} (\text{г см}^{-3})}\right) \cdot 100\% \quad (1)$$

Плотности кондуитов ($\rho_{\text{кондуита}}$) рассчитаны по формуле (2):

$$\rho_{\text{кондуита}} (\text{г см}^{-3}) = \left(\frac{m_{\text{кондуита}} (\text{г})}{\text{Толщина стенки (см)} \cdot \text{Площадь стенки (см}^2\text{)}}\right) \quad (2)$$

Плотность ПОБ ($\rho_{\text{ПОБ}}$) принята $1,2 \text{ г/см}^3$; плотность композита ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК (ρ) рассчитана по формуле (3):

$$\rho = \frac{m_{\text{ПОБ}} + m_{\text{магнетит}}}{\frac{m_{\text{ПОБ}}}{\rho_{\text{ПОБ}}} + \frac{m_{\text{магнетит}}}{\rho_{\text{магнетит}}}} \quad (3)$$

где $m_{\text{ПОБ}}$ и $m_{\text{магнетит}}$ – масса ПОБ и Fe_3O_4 -ЛК МНЧ в кондуите, соответственно; $\rho_{\text{магнетит}}$ – плотность магнетита, принятая $5,1 \text{ г/см}^3$ [91].

Топография поверхности волокон ПОБ и ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК охарактеризована с помощью АСМ (АСМ, Ntegra Spectra II, NT-MDT BV, Нидерланды). Для измерения морфологии поверхности использовался полуконтактный режим АСМ. Картографирование стандартной топографии с разрешением 256×256 точек выполнялось в режиме постукивания. АСМ-измерения проводились с головкой СНА-2 с внешним функциональным генератором и кантилеверами с проводящим Pt-покрытием FMG01 (жесткость пружины 3 Н/м , резонансная частота 60 кГц) на частоте 65 Гц . Чтобы избежать каких-либо артефактов на изображениях АСМ, скорость сканирования составляла $0,1 \text{ Гц}$, а заданное значение $0,5 \text{ нА}$.

Фазовый состав наночастиц Fe_3O_4 -ЛК и кондуитов ПОБ и ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК был проанализирован методом РФА на дифрактометре Rigaku MiniFlex 600 с рентгеновским излучением $\text{CuK}\alpha$ в диапазоне углов рассеяния от 10 до 70° . Размер кристаллитов D_{hkl} был рассчитан по уравнению Шеррера (4):

$$D_{\text{hkl}} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (4)$$

где λ – длина волны рентгеновского излучения, нм; β – ширина пика на полувысоте, рад.; K отражает безразмерный фактор формы частицы и принят 0,9 [92], а θ – дифракционный угол рассеяния, рад.

Спектры КР и оптические фотографии были получены с использованием совмещенной системы NT MDT (Россия), оборудованной объективом 100х. Возбуждение осуществлялось полупроводниковым лазером с длиной волны 633 нм и максимальной мощностью 50 мВт.

Для описания химического состава поверхности образцов была проведена РФЭС с помощью спектрометра Thermo Fisher Scientific XPS NEXSA с монохроматическим рентгеновским источником Al K_{α} при 1486,6 эВ. Спектры РФЭС были сняты с поверхности площадью 200 мкм².

ДСК кондуитов была проведена с помощью аппарата DSC Q2000 в температурном диапазоне от 50 до 250 °С в атмосфере аргона со скоростью нагревания 10 °С/мин. Степень кристалличности (X_c) ПОБ в чистых и композитных кондуитах была рассчитана с помощью формулы (5):

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \cdot 100\%, \quad (5)$$

где теплота плавления 100 % кристаллического ПОБ (ΔH_m^0) равна 145 Дж/г [93].

Физико-механические свойства кондуитов на растяжение были исследованы при комнатной температуре на универсальной испытательной машине Instron 3369 (Instron, США). Многие авторы [94-97] вместо кондуитов используют прямоугольные полоски с идентичными составом и структурой из-за трудностей фиксации трубчатых конструкций в захватах машины. Мы полагаем, что такое упрощение некорректно, и важно исследовать кондуиты именно в той форме, в которой они будут применяться. С этой целью были изготовлены специальные приспособления (Рисунок 2.1) для закрепления трубчатых кондуитов в зажимах испытательной машины Instron. В кондуиты длиной 30 мм с обеих сторон вставляли два стержня (Рисунок 2.1, б, i), которые зажимали между двумя половинками креплений (Рисунок 2.1, б, ii). Две половинки креплений соединяли винтами (Рисунок 2.1, б, iii) для предотвращения выскользывания стержней из образцов во время испытаний. Затем крепления были зажаты плоскими захватами испытательной машины (Рисунок 2.1, а). Рабочая длина образца (расстояние между двумя креплениями) измерялась с помощью штангенциркуля и составляла 15 мм. Образцы растягивались со скоростью 1 мм/мин до разрыва (Рисунок 2.1, в). Механические свойства при растяжении, включая предел прочности при растяжении (σ_{max}), удлинение при разрыве (δ) и модуль Юнга (E), были извлечены из записанных кривых напряжение/деформация. Значения E определялись

как наклон линейного участка кривых. Для каждого значения усреднялись данные не менее пяти образцов каждого типа. Результаты представлены как средние значения \pm стандартные отклонения.

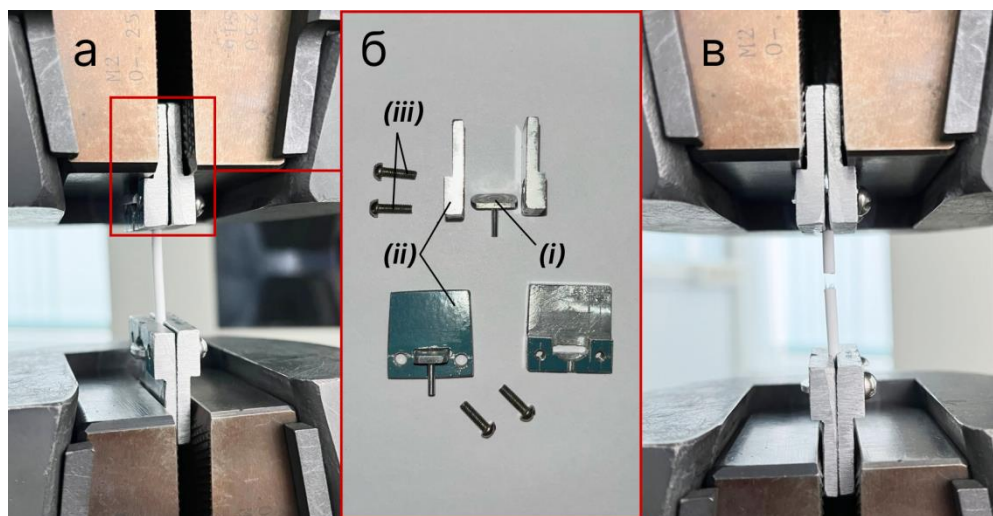


Рисунок 2.1 – Конduit ПОб, вставленный в изготовленные крепления и зафиксированный в захватах машины Instron (а); стержни на пластинах (б, i); половинки креплений (б, ii); винты (б, iii); conduit ПОб после разрыва (в)

Магнитные свойства МНЧ Fe_3O_4 -ЛК и кондуитов ПОб/ Fe_3O_4 -ЛК были изучены при температуре 300 К с внешним переменным МП от 0 до 6,5 кЭ на импульсном магнитометре. Измерения проводились по методике, описанной в [98].

Смачиваемость поверхности скэффолдов была охарактеризована методом гониометрии лежащей капли на цифровом углометре Drop Shape Analysis System DSA25 (KRÜSS GmbH, Германия), как описано ранее [99]. Для измерения нарастающего угла смачивания (θ_a) капля дистиллированной воды объемом 2 мкл помещалась на ровную поверхность образца. Затем вода добавлялась в каплю до тех пор, пока линия контакта воды с образцом не начинала увеличиваться, а краевой угол смачивания не переставал расти. При измерении убывающего угла смачивания (θ_r) вода удалялась из начальной 2 мл капли до тех пор, пока линия контакта не начинала уменьшаться, а угол смачивания не переставал убывать. Гистерезис угла смачивания (θ_h) определялся, как разность значений максимального (θ_a) и минимального (θ_r) углов:

$$\theta_h = \theta_a - \theta_r \quad (6)$$

Для определения поверхностной энергии σ , измерялись статичные углы смачивания чистого ПОб и композита ПОб/ Fe_3O_4 -ЛК с 4 жидкостями: дистиллированная вода, смеси вода/этиленгликоль (ЭГ) (70:30 об./об.), вода/ЭГ (50:50 об./об.) и вода/ЭГ (30:70

об./об.). Для каждой точки использовались как минимум 5 капель. Углы смачивания, измеренные в ImageJ, представлены как усредненное значение со стандартным отклонением (\pm SD). Значение σ было рассчитано по методу Оунса, Вендта, Рабеля и Кьельбле (ОВРК).

2.4 Исследование пролиферации МСК на поверхности кондуитов

Оценку адгезии и роста МСК на кондуитах, изготовленных из чистого ПОБ и с добавлением Fe_3O_4 -ЛК проводили с помощью резазурина. Резазурин – это порошок основе 7-гидрокси-3Нфеноксазин-3-он-10-оксида, который функционирует как индикатор окисления-восстановления. Он представляет собой нетоксичное, проницаемое для клеток и практически не флуоресцентное соединение синего цвета. Попадая в живые клетки, резазурин восстанавливается до резоруфина – соединения красного цвета с высокой флуоресценцией. Преимущество данного красителя заключается в его низкой токсичности и, следовательно, возможности следить за динамикой пролиферации клеток для каждого отдельного образца (элемента выборки). Прролиферация клеток на поверхности кондуитов проводились как в присутствии внешнего переменного низкочастотного МП (0,3 Гц), так и без него, соответственно, было выделено 4 группы экспериментальных образцов: ПОБ; ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК; ПОБ+МП; ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК+МП. В качестве положительного контроля использовали клетки на культуральном пластике под воздействием МП и без него (Пластик и Пластик+МП). Важно отметить, что образцы ПОБ+МП и ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК+МП помещались в установку переменного МП на 2-е сутки после засева, чтобы клетки прикрепились к поверхности кондуитов. Также, на 2-е сутки все кондуиты переносили в новые лунки, чтобы измерения учитывали только клетки, прикрепившиеся к подложке, и исключали влияние клеток, растущих на пластике.

Кондуиты разрезали поперек на трубки длиной 5 мм и повдоль одним разрезом. МСК, выделенные из жировой ткани молодых крыс *Wistar*, культивировали на поверхности кондуитов в среде α -МЕМ (ПАНЕКО, Россия), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ПАНЕКО) при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 . Среду обновляли каждые 3 дня. Клетки из расчета 3 000 клеток на лунку культивировали в течение 11 суток на поверхности чистых и магнитных кондуитов в плоском 96-луночном планшете.

Тестирование с резазурином проводили на 4-е, 7-е и 11-е сутки инкубации. Для проведения тестирования в лунки с кондуитами с МСК добавляли 90 мкл питательной среды α -МЕМ и 10 мкл активированного раствора резазурина и инкубировали в течении 2 часов при 37 °С при медленном перемешивании. Затем окрашенную жидкость переносили

в новый планшет. В заключение клетки промывали ФБС, после чего им возвращали ростовую среду для дальнейшего культивирования, а отобранные окрашенные растворы анализировали на спектрофотометре (Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector), измеряя интенсивность флуоресценции. Длина волны возбуждения 565 нм, испускание детектировали на 595 нм.

2.5 Исследование пролиферации SH-SY5Y на поверхности кондуитов

Данный эксперимент направлен на оценку возможности адгезии и пролиферации нейроноподобных клеток на поверхности исследуемых материалов. Исследование проводили с помощью методики ХТТ. В основе данного метода так же лежит регистрация активности митохондриальных оксидоредуктаз посредством восстановления ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид) и получением окрашенного соединения.

Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y культивировали в среде DMEM/F12 (ПанЭко) в соотношении 1:1, содержащей 15 % инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (ФБС, hiFBS, NuClone), 2 mM L-глутамин (ПанЭко) и 100 мкг/мл гентамицина (Gibco). Культуральную среду меняли каждые 3–4 дня. Когда степень покрытия клетками подложки достигала 70–80 %, клетки высевали с плотностью 10 000 клеток/см². Чтобы оценить адгезию, распластывание и пролиферацию клеток на разных субстратах, клетки культивировали в течение 12 дней в полной культуральной среде. Клетки из расчета 3000 клеток на лунку культивировали в течение 11 суток на поверхности кондуитов в плоском 96-луночном планшете (n=6). ХТТ-тестирование проводили на 3, 8 и 11 сутки. Для проведения тестирования кондуиты с прикрепленными SH-SY5Y перемещали в чистые лунки и добавляли 100 мкл среды DMEM, 50 мкл активированного раствора ХТТ и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С и медленном перемешивании. Затем окрашенные растворы переносили в чистый планшет и проводили измерение оптической плотности растворов на спектрофотометре (Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector) при длинах волн 450 нм и 620 нм.

2.6 СЭМ клеток SH-SY5Y на поверхности кондуитов

Для исследования морфологии клеток на СЭМ образцы кондуитов с прикрепленными к ним живыми клетками на 13-е сутки роста дважды отмывали в фосфатном солевом буфере (БФС) от ростовой среды и фиксировали в течение 2 ч в смеси 2 об. % формалина и 2 об. % глутаральдегида в БФС. Затем образцы подвергали дегидрированию в растворах с повышающейся концентрацией этанола 30, 50, 70, 82, и 96

мас. %, выдерживая по два раза в каждом спиртовом растворе в течение 5 минут. Далее образцы инкубировали 10 минут в смеси гексаметилдисилазана (ГМДС) с этанолом (1:1) и дважды по 10 минут в чистом ГМДС. В третий раз образцы оставляли в ГМДС в открытом сосуде на 12–24 ч до полного испарения вещества. Затем высушенные образцы покрывали платиной на распылительном приборе (IB3, Giko, Япония). Исследование проводили на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6380LA.

3 Результаты и обсуждение

3.1 Исследование свойств магнетита Fe₃O₄-ЛК

Перед получением и исследованием магнитоактивных кондуитов для инженерии нервной ткани, важно изучить морфологию, кристаллическую структуру, химический и фазовый состав синтезированных МНЧ. На снимках СЭМ (Рисунок 3.1, а) наблюдается гомогенное распределение МНЧ со средним диаметром 30 нм. Дифрактограмма МНЧ (Рисунок 3.1, б) включает брэгговские рефлекссы при $2\theta = 18,23^\circ, 30,00^\circ, 35,36^\circ, 37,00^\circ, 42,99^\circ, 53,37^\circ, 56,87^\circ$ и $62,45^\circ$, характерные кристаллографическим плоскостям магнетита (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511) и (440), соответственно. Размер кристаллитов магнетита, рассчитанный по уравнению Шеррера (4), равен 11,6 нм. КР-спектр (Рисунок 3.1, в) содержит три характерные магнетиту полосы при $\sim 313\text{ см}^{-1}, 530\text{ см}^{-1}$ и 668 см^{-1} , отнесенные к симметричным изгибным колебаниям, асимметричным изгибным колебаниям и симметричным валентным колебаниям связей Fe–O, соответственно.

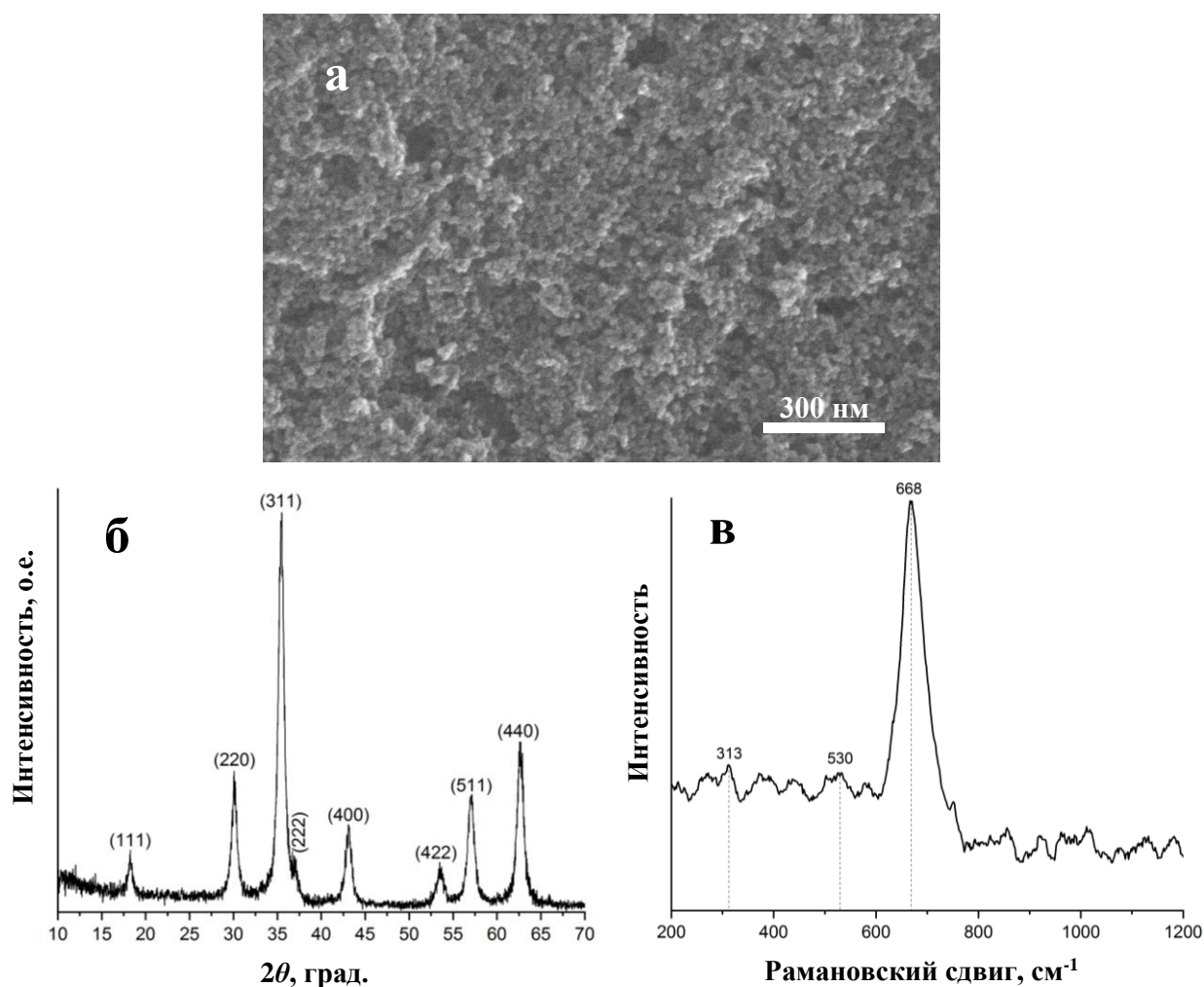


Рисунок 3.1 – Изображение СЭМ (а), дифрактограмма (б) и КР-спектр (в) наночастиц Fe₃O₄-ЛК

3.2 Исследование свойств кондуитов ПОБ и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК

3.2.1 Морфология кондуитов

Морфологическая структура играет важную роль в успешном восстановлении нервных дефектов. В данном исследовании кондуиты были изготовлены методом ЭФ, который является сравнительно простой и эффективной технологией получения нано- и микроволокнистых биоматериалов с высокой удельной поверхностью, а также контролируемой структурой и механическими свойствами. На рисунке 3.2, а–б представлены макрофотографии кондуитов, изготовленных из чистого ПОБ и с добавлением МНЧ Fe₃O₄-ЛК. Большое значение в дизайне кондуитов для регенерации нервной ткани имеет толщина стенки трубки. С одной стороны, толщина должна быть достаточной, чтобы обеспечивать механическую прочность и сопротивление компрессии в условиях *in vivo*. Кроме того, сообщается, что небольшая толщина стенки повышает вероятность развития нейромы [3]. Однако при слишком большой толщине стенки затрудняется обмен нутриентами и кислородом между тканями внутри кондуита и окружающей средой [20]. На основании анализа литературы [7, 21, 102] была выбрана оптимальная толщина стенки кондуита 150–200 мкм и поставлена задача подбора времени ЭФ для получения данной толщины. Была проведена серия экспериментов с различными временами ЭФ от 20 до 60 минут (Таблица 3.1). Толщина стенки измерялась в 15–20 местах по оптическим фотографиям кондуита, поставленного под объектив микроскопа на ребро (Рисунок 3.2, в–г), и усреднялась. Установлено, что оптимальное время синтеза составляет 40 минут.

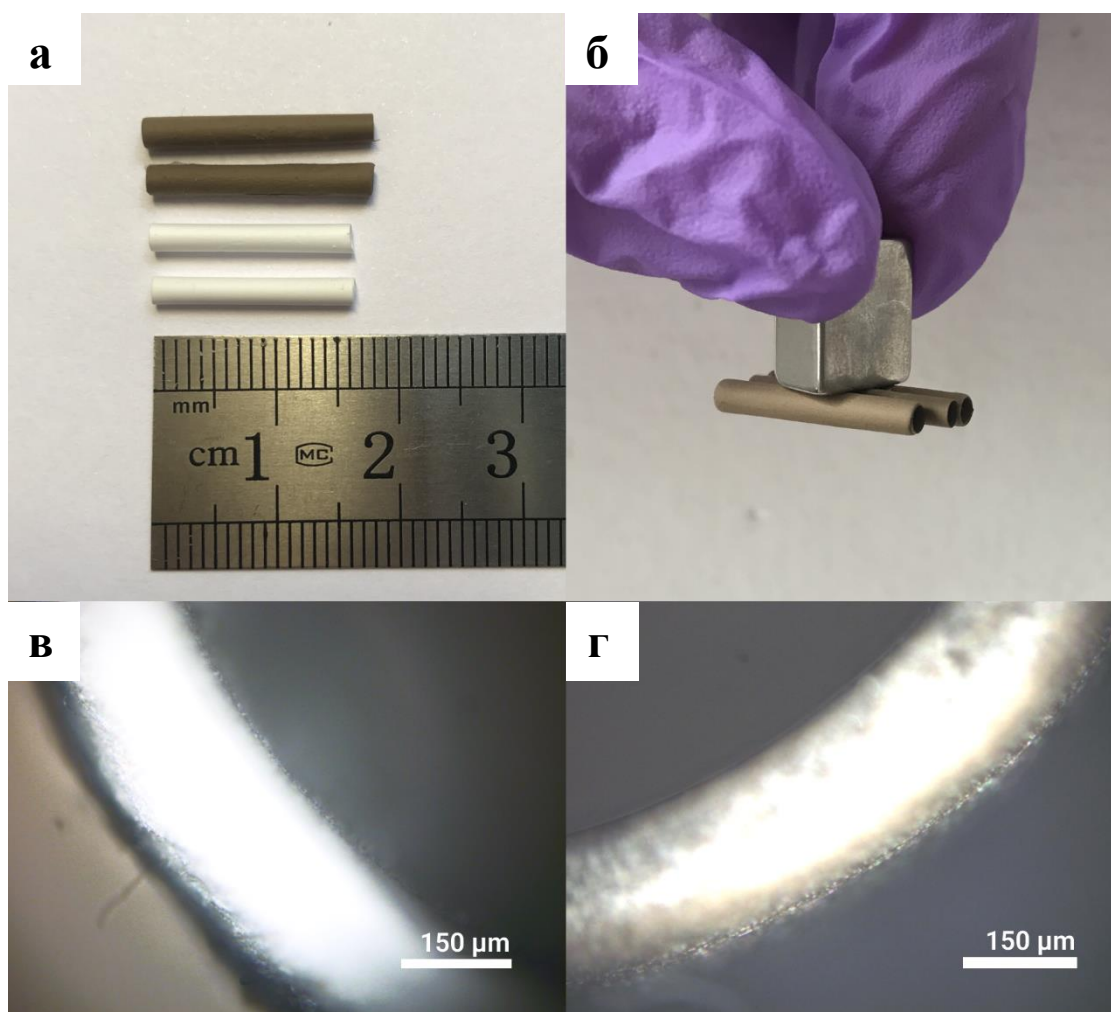


Рисунок 3.2 – Макрофотографии (а–б) кондуитов и фотографии с оптического микроскопа (10х) поперечного сечения кондуита ПОБ (а) и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК (г)

Таблица 3.1 – Оптимизация времени ЭФ

Время ЭФ, мин	20	30	40	50	60
Толщина стенки, мкм	94 ± 16	138 ± 21	194 ± 28	212 ± 24	228 ± 22

Снимки СЭМ (Рисунок 3.3) синтезированных кондуитов демонстрируют проницаемую пористую структуру, представленную бездефектными однородными волокнами со случайным расположением, что свидетельствует о правильном подборе параметров ЭФ. Пористая структура способствует обмену нутриентами, метаболитами и газами между внешней и внутренней средой кондуита. В дополнение, высокая удельная поверхность повышает адгезию клеток, при этом сообщающиеся поры способствуют трехмерному росту клеток [11].

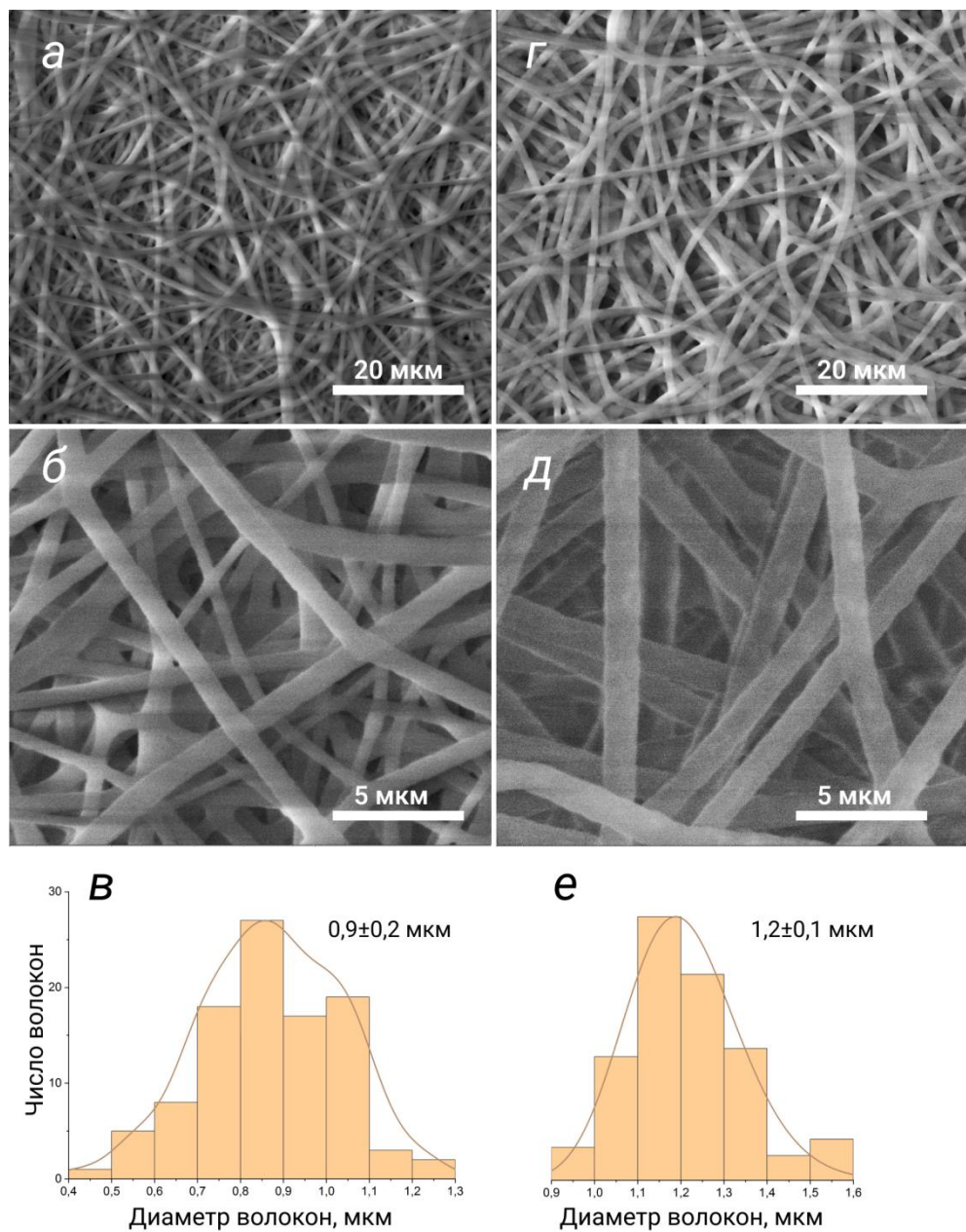


Рисунок 3.3 – Изображения СЭМ (а–б, г–д) и распределения диаметров волокон в чистых (в) и композитных (е) кондуитах

Таблица 3.2 – Морфологические свойства исследуемых кондуитов

Параметр	ПОБ	ПОБ/Fe ₃ O ₄ -ЛК
Диаметр волокон, мкм	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Пористость, %	83,5 ± 2,1	82,3 ± 1,1
Средняя шероховатость (R_a), нм	11,2±1,9	19,4±5,5
Среднеквадратическая шероховатость (R_q), нм	13,5±2,2	23,3±6,2
R_z , нм	15,5±9	29,6±12.9

Диаметры волокон чистого и композитного кондуита, рассчитанные по СЭМ-изображениям, составляют $0,9 \pm 0,2$ и $1,2 \pm 0,1$ мкм. В литературе сообщается, что микроволоконные скэффолды для инженерии нервной ткани с диаметром волокон около 1 мкм демонстрируют хорошие биологические характеристики в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Например, гидрогелиевые волоконные кондуиты на основе желатина с диаметром волокон $1,143 \pm 0,317$ мкм повышают адгезию и пролиферацию НСК *in vitro* [22]. *In vivo* наблюдается ускоренная регенерация нервов при имплантации кондуитов крысам с повреждением спинного мозга [22]. Аналогично, микро топография, представленная волокнами ПМК с диаметром от 1,2 до 1,6 мкм, успешно направляет миграцию нейронов и регенерацию аксонов после повреждения спинного мозга у крыс [103]. В свою очередь, электроформованные кондуиты на основе поли (лактида-*co*-гликолида) и желатина с диаметром волокон $1,05 \pm 0,32$ мкм поддерживают адгезию и пролиферацию НСК, что свидетельствует о биосовместимости данного материала [7]. В исследовании [26] было проведено сравнение длины нейритов и миграции шванновских клеток на волокнах из ПМК с диаметрами $1,325 \pm 0,383$ мкм, 759 ± 179 нм и 293 ± 65 нм. Установлено, что длина нейритов на самых тонких волокнах (293 ± 65 нм) на 42 и 36 % меньше по сравнению с волокнами с диаметрами 759 ± 179 нм и $1,325 \pm 0,383$ мкм, соответственно. Наиболее перспективными для инженерии нервной ткани оказались волокна с диаметром $1,325 \pm 0,383$ мкм, которые обеспечивают одновременно направленное удлинение нейритов и миграцию шванновских клеток [26]. В исследовании [104] были получены скэффолды с диаметрами волокон 283 ± 45 нм, 749 ± 153 нм и $1,452 \pm 0,312$ мкм и показано, что диаметр волокон значительно влияет на дифференцировку и пролиферацию НСК. Установлено, что микроволокна с диаметром $1,452 \pm 0,312$ мкм поддерживают дифференцировку стволовых клеток в нервные клетки [104]. В исследовании [105] были изготовлены полимерные нановолокна (390 и 740 нм) и микроволокна (1,42 мкм) и проведена оценка реакции фибробластов человека на волокнах с различными диаметрами. Установлено, что адгезия и распространение клеток увеличивается с увеличением диаметра волокон от 390 нм до 1,42 мкм. Помимо этого, микроволокна обеспечивают более удлиненную морфологию клеток в сравнении с нановолкнами [105]. Кроме того, сообщается, что клетки линии C2C12 мигрируют быстрее на микроволокнах с диаметром 1,2 мкм по сравнению с нановолкнами (400–700 нм) [106]. На основании приведенного анализа литературы, была поставлена и успешно достигнута задача оптимизации параметров ЭФ для получения кондуитов на основе ПОБ с диаметром волокон ≈ 1 мкм.

Важную роль в дизайне кондуитов для инженерии нервной ткани играет достаточная пористость. В данном исследовании пористость оценивалась гравиметрическим методом

[89, 90] по уравнению (1) и составляет $83,5 \pm 2,1$ и $82,3 \pm 1,1$ % для чистых и магнитоактивных кондуитов, соответственно (Таблица 3.2). Полученные значения пористости достаточны для транспорта нутриентов из внешней среды кондуита во внутреннюю, необходимого для восстановления нерва без инфильтрации нежелательных тканей [4]. Согласно гравиметрии, чистый и композитный кондуиты обладают статистически одинаковой пористостью, однако на СЭМ-изображениях (Рисунок 3.3) наблюдается повышенная пористость в случае кондуита ПОБ/Fe₃O₄-ЛК. Можно предположить, что пористость поверхностных слоев кондуитов, которые видны на СЭМ, может отличаться от пористости в объеме материала. Таким образом, возможна неоднородная пористая структура.

В случае композитного кондуита ПОБ/Fe₃O₄-ЛК (Рисунок 3.3, г–д) внутри волокон равномерно распределены МНЧ без очевидной агломерации. Визуально волокна в данном кондуите обладают большей шероховатостью в сравнении с волокнами из чистого ПОБ. Развитая топография обеспечивает более эффективное взаимодействие между клетками и полимерным композитным матриксом. Для более глубокого понимания влияния МНЧ Fe₃O₄-ЛК на топографию кондуитов ПОБ была проведена АСМ (Рисунок 3.4). На топографических профилях а–b чистых и композитных волокон (Рисунок 3.4, в) наблюдаются однородные цилиндрические микроволокна. Высота волокон хорошо согласуется с диаметром волокон, измеренным по СЭМ (Рисунок 3.3, Таблица 3.2). Профили с–d (Рисунок 3.4, г) демонстрируют шероховатую поверхность обоих образцов со средней шероховатостью (R_a), равной $11,2 \pm 1,9$ и $19,4 \pm 5,5$ нм для волокон из чистого ПОБ и композитных волокон ПОБ/Fe₃O₄-ЛК, соответственно. Наличие шероховатой поверхности как у чистых, так и у композитных волокон обусловлено образованием при ЭФ двух фаз раствора [107], а именно ПОБ, растворенного в СНCl₃, и антирастворителя (т.е. ацетона). Когда свободная от полимера фаза (т.е. ацетон) испаряется из струи во время ЭФ, на поверхности полученного волокна остаются впадины. Важно отметить, что значение R_a волокон на основе ПОБ значительно увеличивается после введения МНЧ (Таблица 3.2, Рисунок 3.4, г). Этот результат также коррелирует с СЭМ-анализом (Рисунок 3.3). Аналогичный результат был получен в исследовании Джонсона и др. [10], в котором добавление 8 мас. % МНЧ Fe₃O₄, покрытых олеиновой кислотой, усилило нанотопографию микроволокон в кондуитах на основе ПМК.

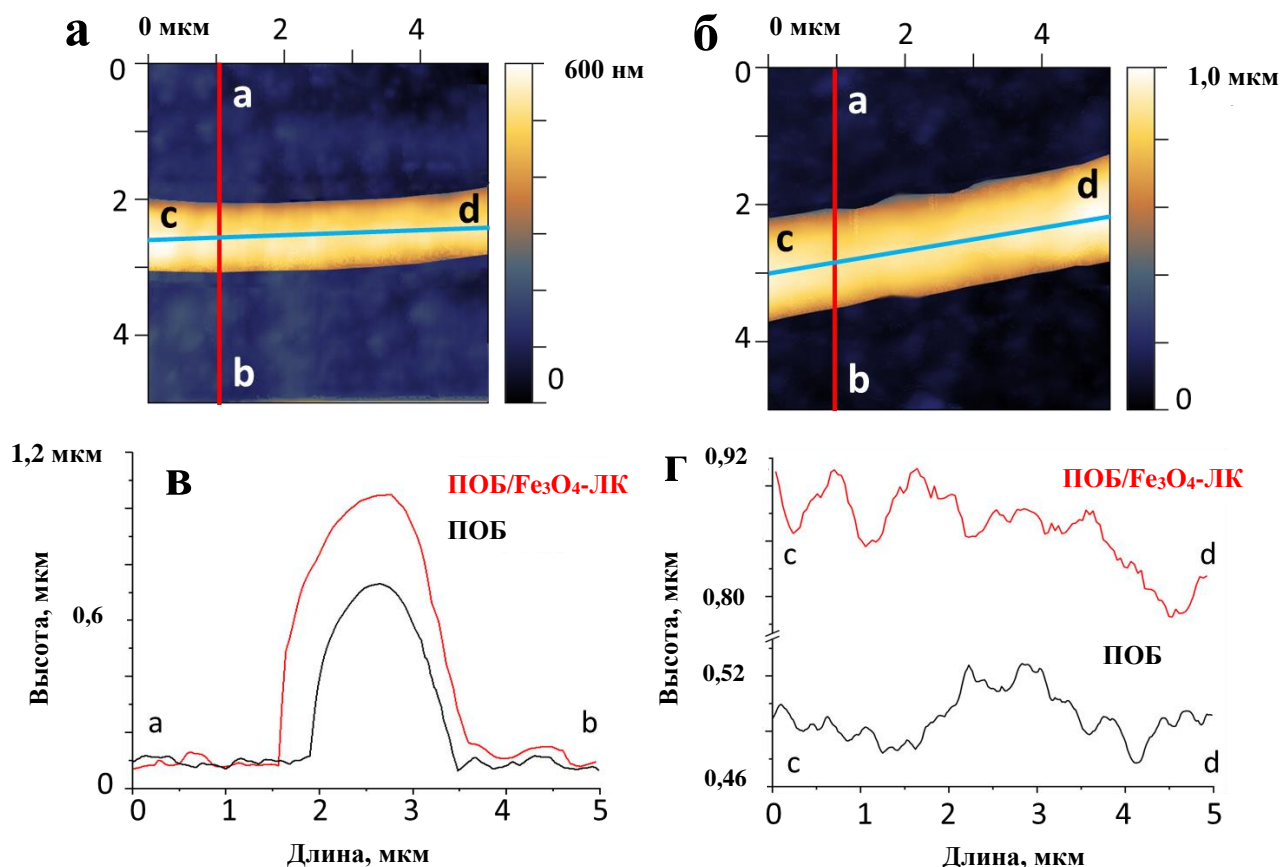


Рисунок 3.4 – Топография поверхности волокон из чистого ПОБ (а) и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК (б): профили а–б (в) соответствуют поперечным сечениям волокон; профили с–д (г) демонстрируют продольные сечения

3.2.2 Кристаллическая структура кондуитов

РФА позволил установить изменения в кристаллической структуре ПОБ, вызванные внедрением МНЧ Fe₃O₄-ЛК. На рисунке 3.5, а представлены нормализованные дифрактограммы чистых кондуитов ПОБ и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК, на которых наблюдаются характерные брэгговские рефлексы орторомбической α-фазы ПОБ (карточка PDF4+ #068–1411). В случае композитного магнитоактивного кондуита наблюдаются дополнительные рефлексы, принадлежащие плоскостям (220), (311), (400), (511) и (440) магнетита с гранецентрированной кубической решеткой типа шпинели.

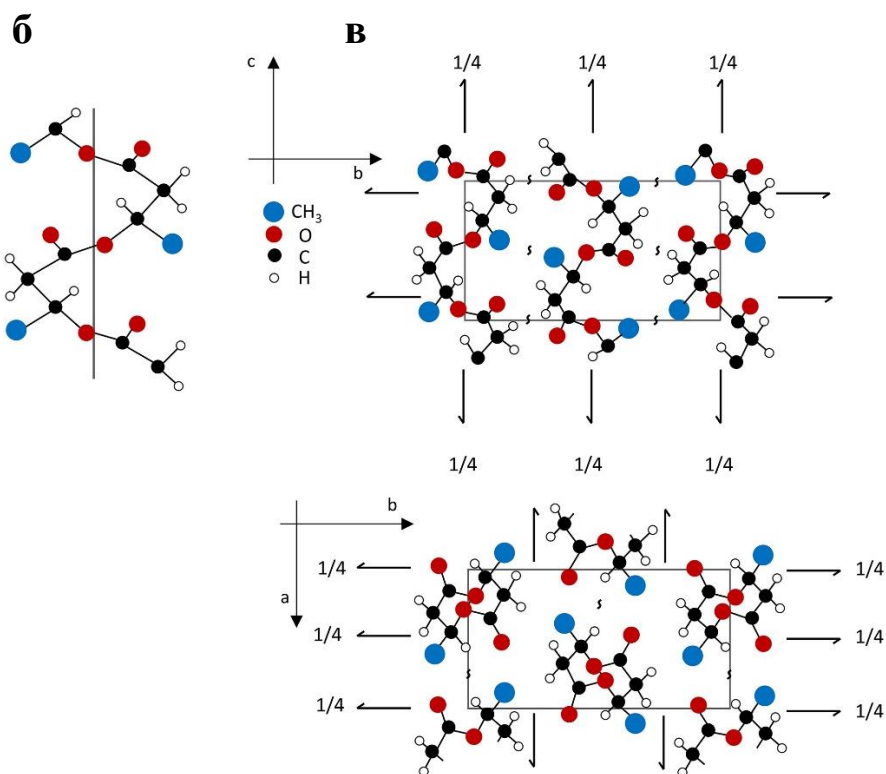
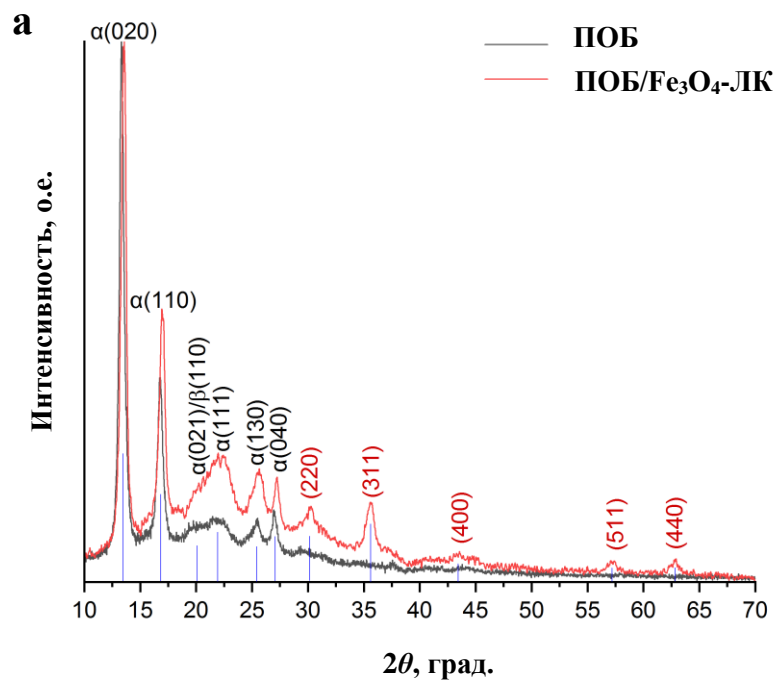


Рисунок 3.5 – Кристаллическая структура ПОБ в кондуитах: а – дифрактограммы исследуемых кондуитов; б – схематическое изображение макромолекулы ПОБ в α -фазе; в – проекции кристаллической ячейки α -фазы ПОБ на плоскости c - b и a - b

Как конduit из чистого ПОБ, так и композитный ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК демонстрируют преобладание пика, отнесенного к плоскости (020) орторомбической α -фазы ПОБ (Рисунок

3.5, а), что указывает на анизотропный рост кристаллов вдоль кристаллографической оси *b* (Рисунок 3.5, в) [108]. При этом внедрение Fe₃O₄-ЛК увеличивает интенсивность других брэгговских рефлексов орторомбической α-фазы ПОБ, а именно пиков (110), (111), (130) и (040) при 16,9°, 22,4°, 25,5° и 26,9°, соответственно. Это изменение может быть обусловлено повышением изотропии кристаллов полимера в композитном магнитоактивном кондуите [109]. В дополнение, размер кристаллитов ПОБ в плоскости (020), рассчитанный по уравнению Шеррера (10), снижается от 17 до 15 нм при добавлении МНЧ в кондуит. Таким образом, МНЧ ограничивают кристаллизацию ПОБ вдоль оси *b* и, тем самым, повышают изотропию кристаллов полимера.

Помимо этого, на дифрактограмме кондуита ПОБ/Fe₃O₄-ЛК (Рисунок 3.5, а) наблюдается увеличение интенсивности рефлекса при ~20°, отнесенного к цепям ПОБ с зигзагообразной конформацией [110-113]. В исследовании [110] данный рефлекс относят к плоскости (110) β-фазы ПОБ. Таким образом, увеличение интенсивности рефлекса при 20° предполагает, что добавление МНЧ Fe₃O₄-ЛК приводит к образованию электроактивной β-фазы ПОБ, представленной зигзагообразными полимерными цепями [113].

3.2.3 Химический состав поверхности магнитных частиц и кондуитов

Для установления химического состава поверхности частиц Fe₃O₄-ЛК и кондуитов ПОБ и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК была проведена РФЭС (Рисунок 3.6). В спектре C 1s наночастиц Fe₃O₄-ЛК (Рисунок 3.6, б) наблюдаются пики с энергией связи 285,4, 286,9 и 288,8 эВ, соответствующие группам C-C/C-H, C-O и C=O, соответственно. Появление данных полос подтверждает наличие ЛК на поверхности МНЧ [114]. Спектр высокого разрешения O 1s частиц Fe₃O₄-ЛК, помимо пиков связей C-O и C=O, включает полосу Fe-O, принадлежащую Fe₃O₄ (Рисунок 3.6, в). Спектр Fe 2p частиц (Рисунок 3.6, г) также подтверждает функциональный состав поверхности Fe₃O₄-ЛК [115].

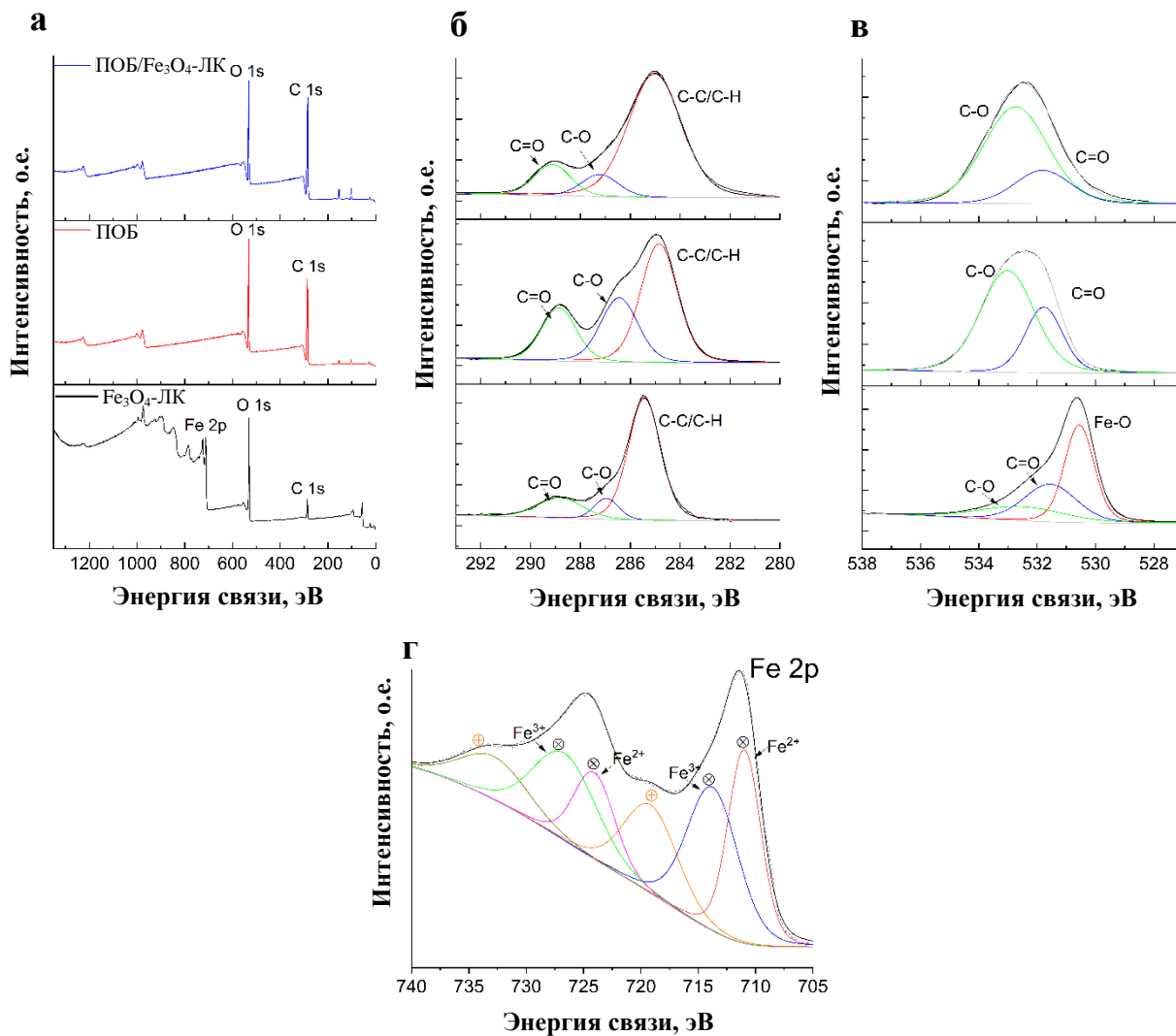


Рисунок 3.6 – Общие спектры (а) и спектры высокого разрешения (б–г) МНЧ Fe₃O₄-ЛК, кондуитов ПОБ и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК

Спектры высокого разрешения C 1s и O 1s кондуитов ПОБ и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК содержат характеристические пики ПОБ с энергией связи 284,9 (C-C/C-H), 286,4 (C-O), 288,9 (C=O), 531,7 (C=O) и 533,0 эВ (C-O). Согласно общему спектру композитного кондуита (Рисунок 3.6, а), в исследуемом поверхностном слое не детектируется наличие Fe₃O₄-ЛК. Таким образом, МНЧ расположены внутри волокон на глубине, превышающей предел обнаружения методом РФЭС (3–15 нм) [116].

3.2.4 Фазовый и химический состав кондуитов

Для изучения химического и фазового состава разработанных кондуитов была проведена КР-спектроскопия. На рисунке 3.7 представлены оптические фотографии (а–г) и соответствующие им КР-спектры кондуитов из чистого ПОБ и композита ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК, полученные в трех точках с различной степенью агломерации магнетита. Наиболее интенсивный пик в спектрах композитного кондуита (Рисунок 3.7, е–з) соответствует симметричным валентным колебаниям связи Fe–O магнетита. В то же время, не наблюдается пиков других магнитных фаз с меньшей намагниченностью, таких, как маггемит [117]. Это свидетельствует о фазовой чистоте и устойчивости к окислению полученных частиц магнетита. Таким образом, в процессе ЭФ не происходит окисления и фазовых превращений Fe_3O_4 -ЛК, благодаря поверхностной модификации лимонной кислотой.

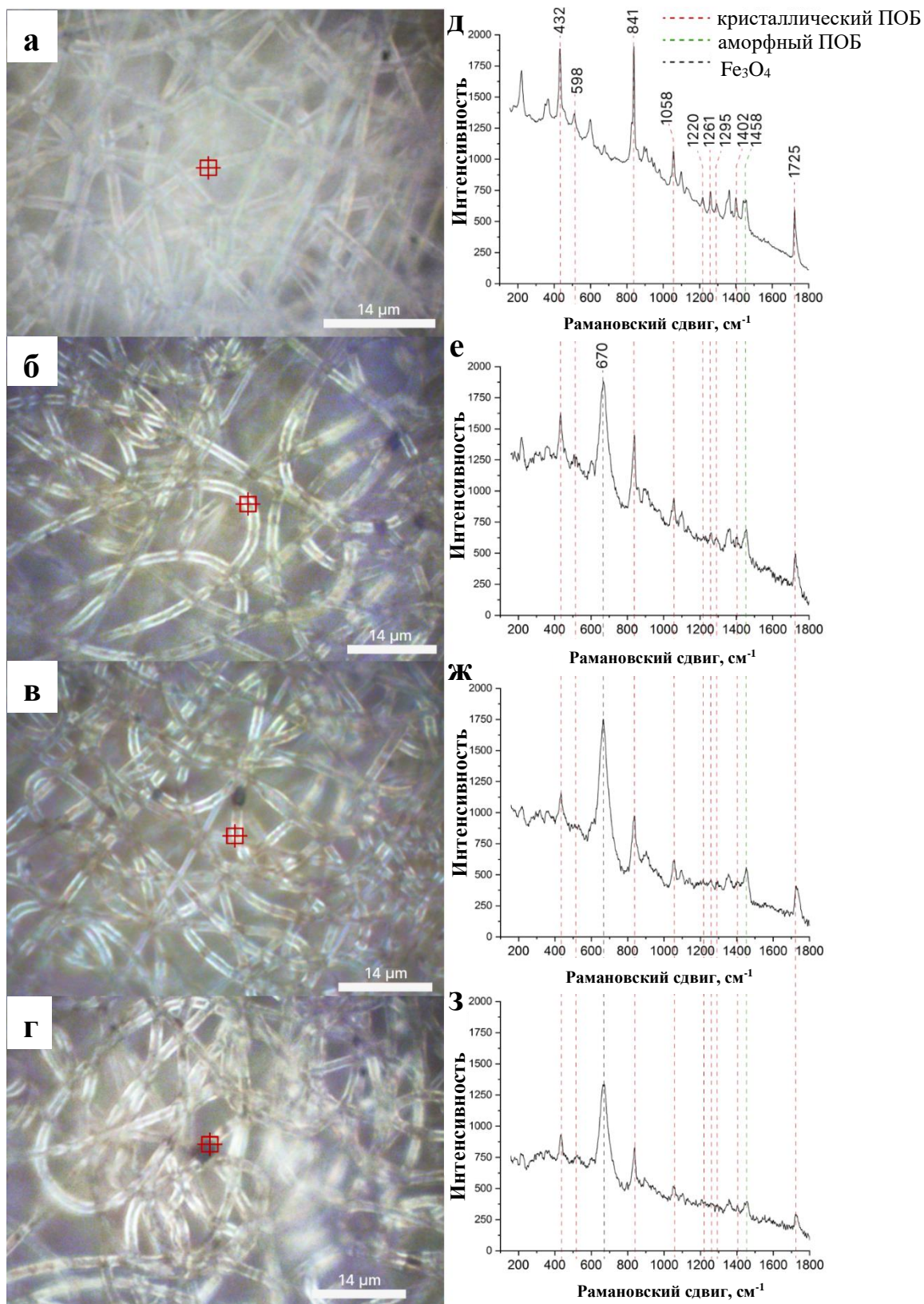


Рисунок 3.7 – Оптические фотографии (а–г) и соответствующие нормализованные КР-спектры (д–з) кондуитов ПОБ (а, д) и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК (б–г, е–з). Спектры композита были получены для волокна с равномерно распределенным магнетитом (б, е); полимера, находящегося рядом с агломератом ПОБ/Fe₃O₄-ЛК (в, ж); ПОБ, контактирующего с агломератом (г, з). Красная отметка соответствует точке, на которую наводился лазер

3.2.5 Термический анализ кондуитов

С целью количественного сравнения степени кристалличности полимера (X_c) в кондуитах из чистого ПОб и композите ПОб/ Fe_3O_4 -ЛК была проведена ДСК. Кривые ДСК и термические свойства исследуемых образцов приведены на рисунке 3.8 и в таблице 3.3, соответственно. По данным таблицы 3.3, рассчитанное значение X_c снижается с введением МНЧ Fe_3O_4 -ЛК от 58,5 до 54,0 %. Сниженная кристалличность ПОб в композите может быть связана с ограничением мобильности полимерных цепей наночастицами Fe_3O_4 -ЛК и, как следствие, их кристаллизацией полимера [120-126]. Аналогичный эффект был описан в исследовании [126], в котором добавление 5 мас. % наночастиц магнетита снизило кристалличность ПОб от 53,1 до 47,9 %. Этот результат авторы объясняют ограничением упорядоченного расположения цепей вследствие наличия Fe_3O_4 .

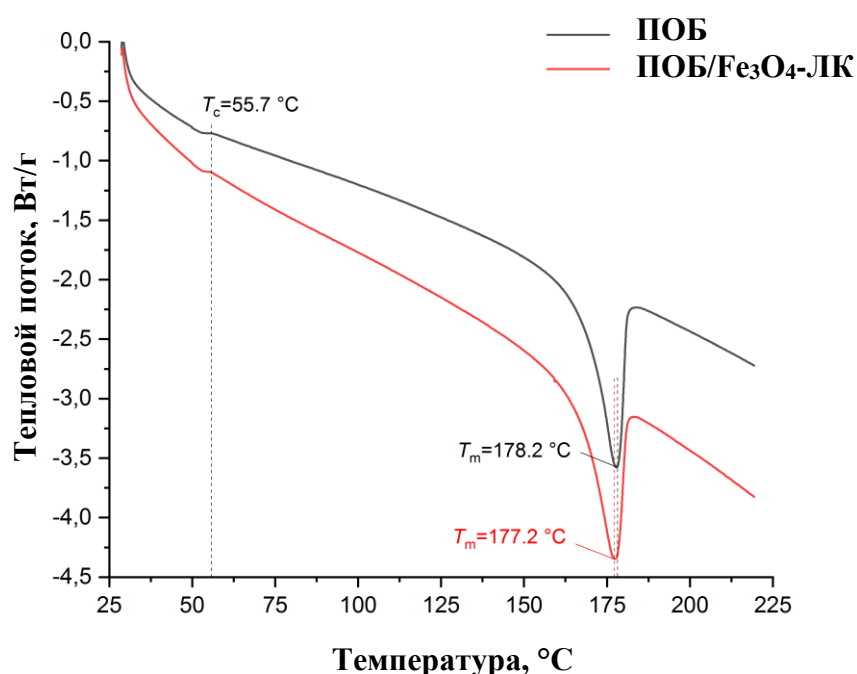


Рисунок 3.8 – Кривые ДСК исследуемых кондуитов

Таблица 3.3 – Термические свойства исследуемых кондуитов

Образец	$\Delta H_{пл}$, Дж/г	X_c , %	$T_{пл}$, °С
ПОБ	85,44	58,5	178,2
ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК	78,87	54,0	177,2

Кроме того, установлено снижение температуры плавления ($T_{пл}$) ПОб в композитном кондуите, по сравнению с чистым, от 178,2 до 177,2 °С. Изменение $T_{пл}$ можно объяснить различием в размерах и совершенстве кристаллов ПОб в исследуемых образцах

[129, 130]. Размеры кристаллитов в плоскости (020) орторомбической α -фазы ПОБ, рассчитанные по уравнению Шеррера (10), больше в случае кондуитов из чистого ПОБ (17 нм), чем ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК (15 нм). Помимо этого, РФА чистого кондуита ПОБ (Рисунок 3.5) позволил установить более анизотропную несовершенную структуру полимерных кристаллов. По этим причинам, ПОБ в чистом кондуите обладает более высокой $T_{\text{пл}}$ по сравнению с композитным.

3.2.6 Физико-механические свойства кондуитов

Чтобы оценить, соответствуют ли механические свойства кондуитов достаточной прочности и эластичности для применения в инженерии нервной ткани, были проведены испытания на растяжение (Рисунок 2.1). В ходе данных испытаний было установлено влияние наночастиц Fe_3O_4 -ЛК на механические свойства электроформованного полимера. Кривые напряжения/деформации и основные механические характеристики кондуитов из чистого ПОБ и композита ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК представлены на рисунке 3.9 и в таблице 3.4, соответственно. Для сравнения также приведены литературные данные по механическим свойствам различных нервов человека и других животных. Кондуиты должны быть достаточно гибкими, чтобы обеспечивать подвижность суставов без пережатия нервов, а также выдерживать наложение швов без растрескивания и деформации [131]. Кондуиты на основе чистого ПОБ характеризуются высокой жесткостью и хрупкостью, о чем свидетельствует модуль Юнга равный 468 ± 11 МПа. Это значение, согласно таблице 3.4, превышает модуль Юнга различных нервов на 1–3 порядка. Важно отметить, что добавление 8 мас. % частиц Fe_3O_4 -ЛК в матрицу ПОБ снижает модуль Юнга более чем в два раза (от 468 ± 11 до 221 ± 52 МПа), придавая композитным кондуитам ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК более эластичные гибкие свойства, необходимые для применения в инженерии нервной ткани. Более того, введение Fe_3O_4 -ЛК значительно увеличивает удлинение кондуитов при разрыве от $17,9 \pm 3,6$ до $28,6 \pm 2,9$ %, что также приближает свойства композитных кондуитов к свойствам эластичной нервной ткани (Таблица 3.4). Этот результат можно объяснить улучшенным межфазным взаимодействием между ПОБ и Fe_3O_4 за счет модификации ЛК, что позволяет кондуитам дольше сопротивляться нагрузке и растягиваться [132]. При этом максимальная прочность на растяжение ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК снижается от $6,2 \pm 0,7$ до $3,9 \pm 0,7$ МПа по сравнению с чистыми кондуитами, однако это значение сравнимо с механическими свойствами многих нервов (Таблица 3.4) и, следовательно, оптимально для целевого применения. Описанные изменения указывают на повышенную пластичность каналов ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК в сравнении с чистым ПОБ, что благоприятно для регенеративной медицины нервов. В целом, композитные кондуиты

демонстрируют механические характеристики, сравнимые с клинически используемыми материалами, такими как кондуиты Neurolac® [133].

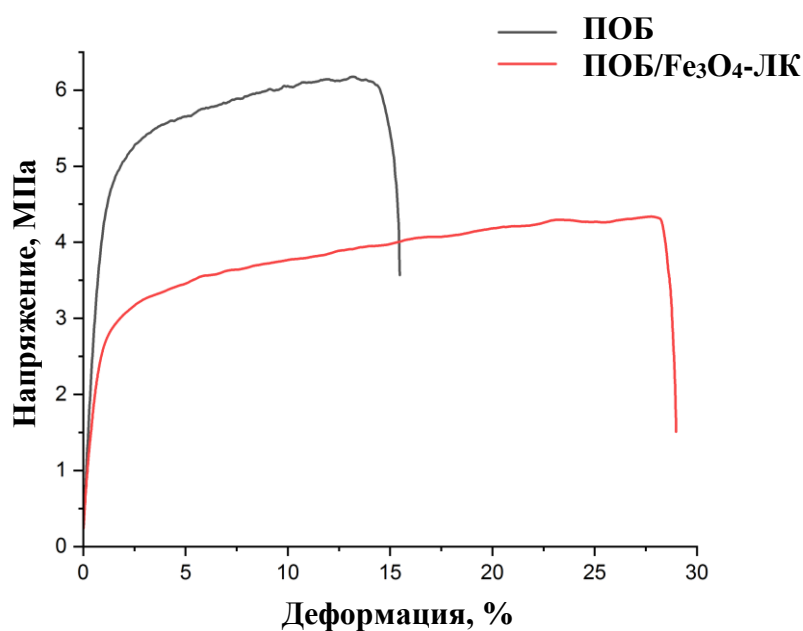


Рисунок 3.9 – Кривые напряжения/деформации исследуемых кондуитов

Таблица 3.4 – Физико-механические свойства кондуитов в сравнении с различными нервами человека и животных

Образец	Максимальная прочность на растяжение, МПа	Удлинение при разрыве, %	Модуль Юнга, МПа	Источник
ПОб	6,2 ± 0,7	17,9 ± 3,6	468 ± 11	Данное исследование
ПОб/Fe ₃ O ₄ -ЛК	3,9 ± 0,7	28,6 ± 2,9	221 ± 52	
Седалищный нерв крысы	1,4 ± 0,3	48,0 ± 11,7	0,58 ± 0,16	[134]
	6,1 ± 1,5	49,2 ± 2,4	13,79 ± 5,48	[135]
Нервы спинного мозга крысы	0,62 ± 0,31	30,8 ± 8,4	2,9 ± 1,5	[136]
Седалищный нерв человека	–	–	40,96 ± 2,59	[137]
Средний малоберцовый нерв человека	3,88 ± 1,47	~ 60 %	10,41 ± 2,85	[138]
Средний большеберцовый нерв человека	3,91 ± 0,92	~ 35 %	9,50 ± 2,84	
Большеберцовый нерв кролика	11,7 ± 7,0	38,5 ± 2,0	–	[139]

3.2.7 Магнитные свойства наночастиц Fe₃O₄-ЛК и кондуитов ПОб/Fe₃O₄-ЛК

Петли гистерезиса МНЧ Fe₃O₄-ЛК и кондуита ПОб/Fe₃O₄-ЛК представлены на рисунке 3.10, а–б, соответственно. Основные магнитные характеристики сведены в таблицу 3.5, а именно: намагниченность насыщения (σ_s), остаточная намагниченность (σ_r), коэрцитивная сила (H_c) и коэффициент прямоугольности (σ_r/σ_s). Согласно петлям магнитного гистерезиса, как МНЧ Fe₃O₄-ЛК, так и кондуит ПОб/Fe₃O₄-ЛК достигают насыщения при МП, равном 6,5 кЭ. Значение σ_s Fe₃O₄-ЛК составляет $61,88 \pm 0,29$ эме/г, что ниже намагниченности поликристаллического Fe₃O₄, известной из литературы [140]. Сниженные значения σ_s полученных частиц Fe₃O₄-ЛК связано с малым размером кристаллитов (11 нм), рассчитанным по формуле Шеррера (4). Это значение во много раз меньше размера одного магнитного домена, который для магнетита составляет приблизительно 128 нм [141]. Низкие значения σ_r , H_c и σ_r/σ_s предполагают свойства частиц Fe₃O₄-ЛК, близкие к суперпарамагнитным. Несмотря на это, МНЧ обладают ненулевым значением H_c , которое зависит не только от размеров кристаллитов, но и от их формы. Кристаллиты исследуемого Fe₃O₄-ЛК не обладают идеальной сферической формой, что приводит к анизотропии формы и вносит вклад в наличие коэрцитивной силы.

Таблица 3.5 – Магнитные свойства МНЧ Fe₃O₄-ЛК и кондуитов ПОб/Fe₃O₄-ЛК

Образец	σ_s , эме/г	σ_r , эме/г	H_c , Э	σ_r/σ_s , о.е.
Fe ₃ O ₄ -ЛК	$61,88 \pm 0,29$	$0,52 \pm 0,10$	$8,6 \pm 0,3$	0,008
ПОб/Fe ₃ O ₄ -ЛК	$7,44 \pm 0,07$	$0,40 \pm 0,04$	42 ± 2	0,05

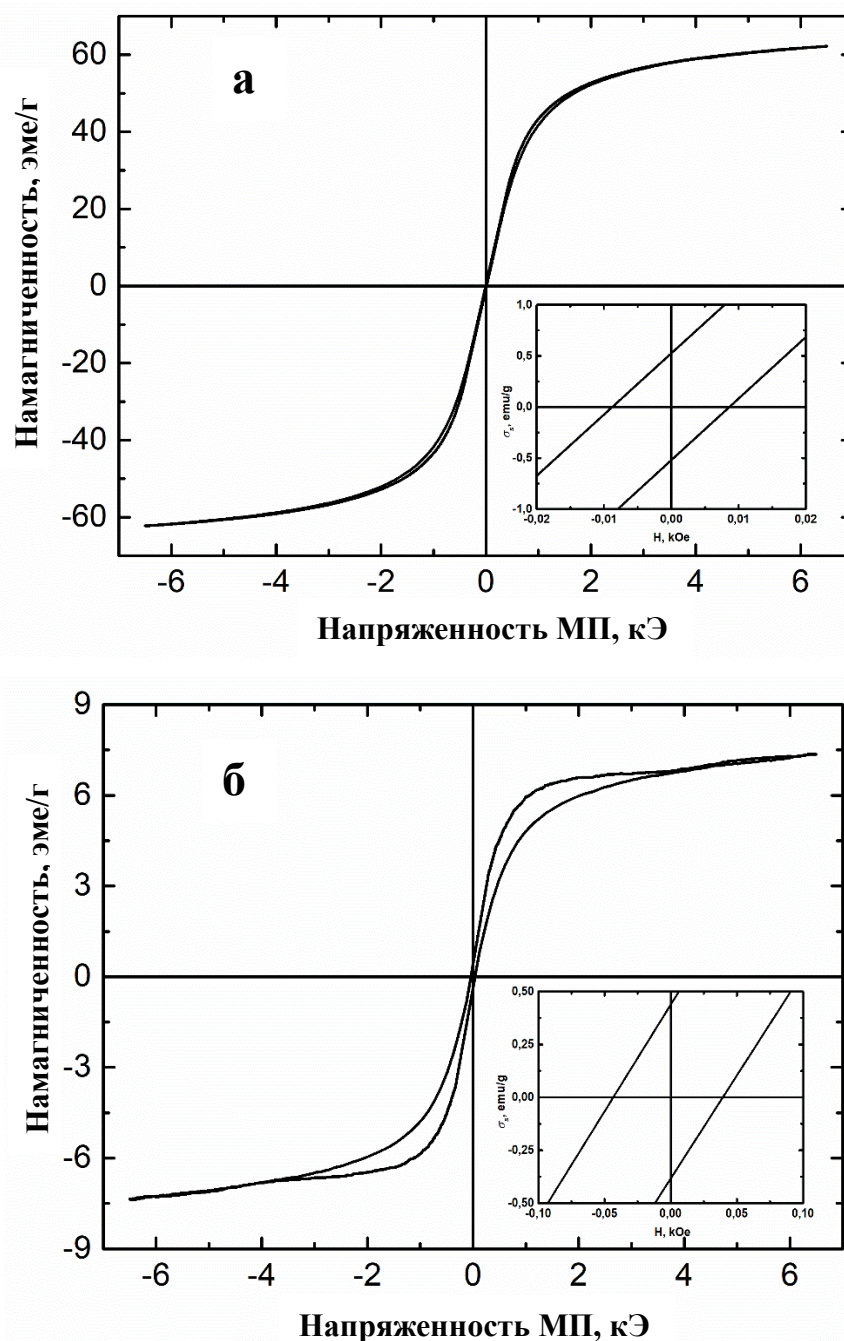


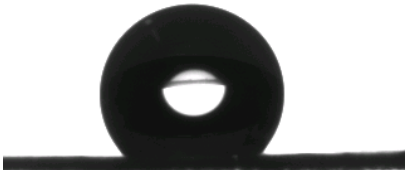





Рисунок 3.10 – Петли магнитного гистерезиса МНЧ Fe₃O₄-ЛК (а) и кондуитов ПОБ/Fe₃O₄-ЛК (б)

H_c кондуита ПОБ/Fe₃O₄-ЛК составляет 42 ± 2 Э, что практически в 5 раз превышает H_c частиц Fe₃O₄-ЛК. Известно, что наличие примесей немагнитной фазы в материале и внутренние напряжения вызывают увеличение H_c [141]. Композит ПОБ/Fe₃O₄-ЛК с небольшим содержанием магнитной фазы сложнее демагнетизировать вследствие сопротивления волокна ПОБ, которое предотвращает выравнивание магнитных моментов в частицах Fe₃O₄-ЛК.

3.2.8 Смачиваемость поверхности кондуитов

Смачиваемость поверхности является важным свойством скэффолдов для тканевой инженерии, которое определяет клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку *in vitro* и рост новых тканей *in vivo* [144, 145]. В связи с этим, методом лежащей капли были измерены статический (θ_s), нарастающий (θ_a) и убывающий (θ_r) углы смачивания чистого ПОб и композита ПОб/ Fe_3O_4 -ЛК. Гистерезисы угла смачивания (θ_h) рассчитаны по формуле (6); значения поверхностной энергии σ определяли методом ОВРК. Указанные характеристики смачиваемости исследуемых образцов сведены в таблицу 3.6. Как чистый, так и композитный кондуиты имеют гидрофобную природу со значениями θ_s , равными $129,7 \pm 0,8^\circ$ и $125,7 \pm 1,1^\circ$ для чистого ПОб и композита ПОб/ Fe_3O_4 -ЛК, соответственно, что согласуется с литературными данными [20, 70, 146, 147]. Установлено снижение θ_s кондуитов ПОб после добавления МНЧ Fe_3O_4 -ЛК. Кроме того, значения θ_a и θ_r , отражающие, соответственно, максимальный и минимальный возможный θ для исследуемого материала, демонстрируют похожий тренд, т.е. сниженные значения после добавления МНЧ Fe_3O_4 -ЛК (Таблица 3.6). Улучшенная гидрофильность композита ПОб/ Fe_3O_4 -ЛК согласуется с более высокими значениями σ , которая значительно увеличивается от $53,0 \pm 1,5$ до $72,2 \pm 2,5$ мН/м при введении МНЧ. В дополнение, θ_h увеличивается от $22,9 \pm 1,7^\circ$ до $26,9 \pm 2,6^\circ$ для кондуитов ПОб и ПОб/ Fe_3O_4 -ЛК. Описанные изменения в смачиваемости кондуитов могут быть связаны с комбинацией нескольких факторов, включая (1) химический состав поверхности; (2) поверхностная шероховатость; (3) пористость.

Таблица 3.6 – Смачиваемость исследуемых кондуитов

	ПОБ	ПОБ/Fe ₃ O ₄ -ЛК
θ_s , град.	 129,7 ± 0,8	 125,7 ± 1,1
θ_a , град.	 135,0 ± 1,1	 129,2 ± 2,1
θ_r , град.	 112,1 ± 0,9	 102,3 ± 1,2
θ_h , град.	22,9 ± 1,7	26,9 ± 2,6
σ , мН/м	53,0 ± 1,5	72,2 ± 2,5
σ_p , мН/м	47,2 ± 1,2	64,2 ± 2,0
σ_d , мН/м	5,9 ± 0,3	8,2 ± 0,5

1) В литературе [148-151] сообщается, что смачиваемость материалов может изменяться вследствие модификации химического состава поверхности при введении различных частиц в полимерные волокна в процессе ЭФ. Например, в исследовании [149] гидрофильность бленда ПОБ/ПКЛ была существенно улучшена после добавления биоактивного стекла 58S. В работе [150] наблюдалась дозозависимое снижение углов смачивания волокон ПКЛ от $124,5 \pm 1,1^\circ$ до $116,2 \pm 1,4^\circ$ после добавления до 0,5 мас. % гидрофильных частиц наноцеллюлозы (НЦ). В свою очередь, в исследовании [151] гидрофильность нановолоконных мембран на основе ПВДФ была усилена введением до 0,4 мас. % оксида графена (ОГ), о чем свидетельствует постепенное снижение углов смачивания мембран от 70° до 40° . Авторы объясняют гидрофилизующий эффект ОГ наличием гидрофильных карбоксильных, гидроксильных и эпоксидных групп. В нашем исследовании в матрикс ПОБ были введены наночастицы Fe₃O₄, модифицированные гидрофильной ЛК. Однако по данным РФЭС (Рисунок 3.6), Fe₃O₄-ЛК отсутствуют в

исследуемом поверхностном слое (3–15 нм), что можно объяснить различием поверхностной энергии МНЧ Fe_3O_4 -ЛК и полимера [148]. Как правило, гидрофильные материалы (в нашем случае, Fe_3O_4 -ЛК) обладают большей поверхностной энергией, в то время как гидрофобные материалы (ПОБ) – меньшей энергией. Поскольку поверхностная энергия частиц превышает энергию полимера, частицы стремятся вглубь полимерного матрикса, чтобы снизить энергию системы и, тем самым, установить термодинамическое равновесие. Этот эффект гидрофильных частиц внутри гидрофобного полимера, а не на его поверхности был описан на примере различных частиц, включая НЦ, модифицированную полиэтиленгликолем (ПЭГ) [152]; ОГ, модифицированный ПЭГ [153]; наножелатин. Это приводит к неэффективной гидрофилизации поверхности композитных волокон. Таким образом, снижение углов смачивания в случае кондукта ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК в сравнении с чистым ПОБ, скорее всего, связано не с гидрофильными частицами Fe_3O_4 -ЛК, а с другими факторами, описанными далее.

2) Шероховатость поверхности является важным фактором, определяющим смачиваемость полимеров [154-161]. На снимках СЭМ (Рисунок 3.2) видно, что композитные волокна ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК обладают большей шероховатостью и более развитой поверхностной нанотопографией. Это также подтверждают измерения АСМ, в ходе которых установлено значительное увеличение значения R_a композитных волокон от $11,2 \pm 1,9$ до $19,4 \pm 5,5$ нм по сравнению с чистыми (Таблица 3.2). Существует две теоретические модели смачивания гидрофобных шероховатых материалов, а именно модель Венцеля [162] и модель Кэсси [161]. В модели Кэсси между «пиками» на шероховатой поверхности скапливается воздух, что приводит к образованию границ раздела «жидкость-воздух» и «жидкость-твёрдый материал» (Рисунок 3.11, а) [163]. По Венцелю, жидкость полностью заполняет «впадины» на шероховатой поверхности (Рисунок 3.11, б) [157]. Несколько авторов [154-156, 158] сообщают, что увеличение шероховатости гидрофобных материалов приводит также к увеличению углов смачиваемости и, следовательно, повышению гидрофобности. Вэнг и др. [154] исследовали влияние топографии поверхности тефлона на смачиваемость и установили, что с увеличением поверхностной шероховатости значения θ_a и θ_r сначала возрастают до определенного максимума, после чего начинают снижаться, в то время как θ_h демонстрирует противоположный тренд. Эти нелинейные тренды авторы связывают с переходами между состояниями Венцеля и Кэсси. Согласно данной работе, снижение значений θ_a и θ_r с одновременным увеличением θ_h для более шероховатого материала (в нашем случае – композита ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК) указывает на переход из состояния Кэсси в

состояние Венцеля, т.е. исчезает граница «жидкость-воздух» вследствие увеличения расстояния между «пиками» на поверхности и давления жидкости (Рисунок 3.11).

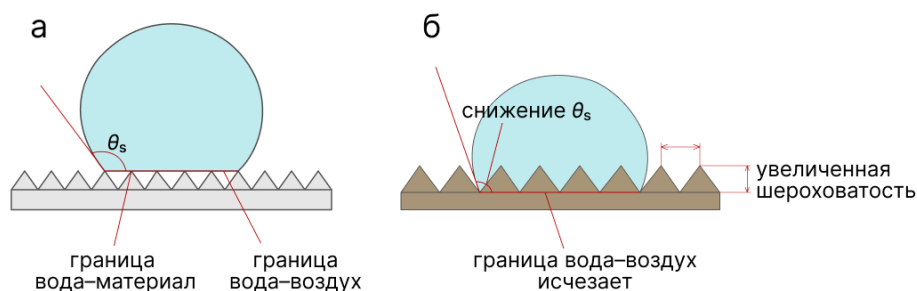


Рисунок 3.11 – Предполагаемые механизмы смачивания поверхностей ПОБ (модель Кэсси, а) и ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК (модель Венцеля, б)

3) Как отмечалось ранее, согласно СЭМ (Рисунок 3.2, б, д), поверхностный слой композитного кондуита более пористый в сравнении с чистым, что также может снижать углы смачивания кондуитов после добавления МНЧ Fe_3O_4 -ЛК. Более пористая поверхность может поглощать больше воды вследствие более легкого проникания воды через поры. Это может объяснять гидрофилизацию ПОБ с введением Fe_3O_4 -ЛК.

3.3 Исследование биологических свойств кондуитов ПОБ и ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК

3.3.1 Оценка пролиферации МСК на кондуитах *in vitro*

МСК широко используются в исследованиях скэффолдов для оценки их биосовместимости и применимости в инженерии нервной ткани. Многими авторами была показана дифференцировка МСК в нервные клетки на поверхности скэффолдов на основе ПОА [28, 72], ПВДФ [50, 51, 58] и других полимеров [41]. Например, в исследовании [41] показана возможность нейронной дифференцировки МСК, полученных из костного мозга крыс, под действием электрической стимуляции проводящими микроволоконными скэффолдами. Также нейронная дифференцировка МСК возможна с применением пьезоэлектрических скэффолдов ПВДФ, о чем свидетельствует экспрессия нейронных маркеров и удлинение нейритов [50, 51, 58].

Распространенной стратегией стимуляции восстановления нервов является имплантация кондуитов, содержащих нейроноподобные клетки, такие как шванновские или нервные стволовые клетки [14, 30, 75]. Однако применение данного подхода в клинической практике ограничено вследствие низкой доступности указанных клеток. Несколько авторов использовали кондуиты с предварительно прикрепленными МСК для восстановления поврежденных нервов крыс *in vivo*. Например, кондуиты ПОБ/хитозан,

засеянные МСК человека, демонстрировали лучшую способность к восстановлению дефекта седалищного нерва крысы в сравнении с контрольными кондуитами ПОВ/хитозан [72]. В свою очередь, работа [28] направлена на комбинацию ориентированных нановолокон ПОВВ с МСК жировой ткани для имплантации в область повреждения нервов крыс. Исследование пролиферации МСК на нановолокнистых скэффолдах позволило установить биосовместимость материала [28]. В результате имплантации кондуиты с МСК способствовали восстановлению нервов и их моторных функций со значением SFI равным $- 34,7 \pm 1,2$ на 10-й неделе после операции [28].

Таким образом, полимерные кондуиты, предварительно засеянные МСК, являются перспективным материалом для инженерии нервной ткани. В данной работе исследована возможность адгезии и пролиферации МСК на разработанных магнитоактивных кондуитах как в обычных условиях роста, так и под воздействием низкочастотного МП. Целью данного эксперимента было установление влияния МНЧ, а также внешнего переменного МП на пролиферацию МСК. В литературе сообщается о положительном эффекте указанных факторов на пролиферацию различных клеточных линий. В исследовании [164] наблюдается ускоренная пролиферация пре-остеобластов MC3T3-E1 на магнитных пленках $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{pHA/PLA}$ в сравнении с контрольным pHA/PLA, что свидетельствует о благоприятном влиянии парамагнитных частиц на рост костных клеток. Помимо этого, применение МП с индукцией 0,9-1,0 мТл значительно повышает пролиферацию MC3T3-E1 как на пленках pHA/PLA, так и на магнитном композите $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{pHA/PLA}$ [164]. Таким образом, комбинация наночастиц $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ в полимерных волокнах и МП оказывает наилучшее влияние на пролиферацию клеток. Аналогичный результат опубликован в исследовании [165], в котором MC3T3-E1 выращивали на электроформованных скэффолдах PLLA/Fe₃O₄. О положительной роли МНЧ и МП на пролиферацию клеток сообщается и в других работах [166, 167].

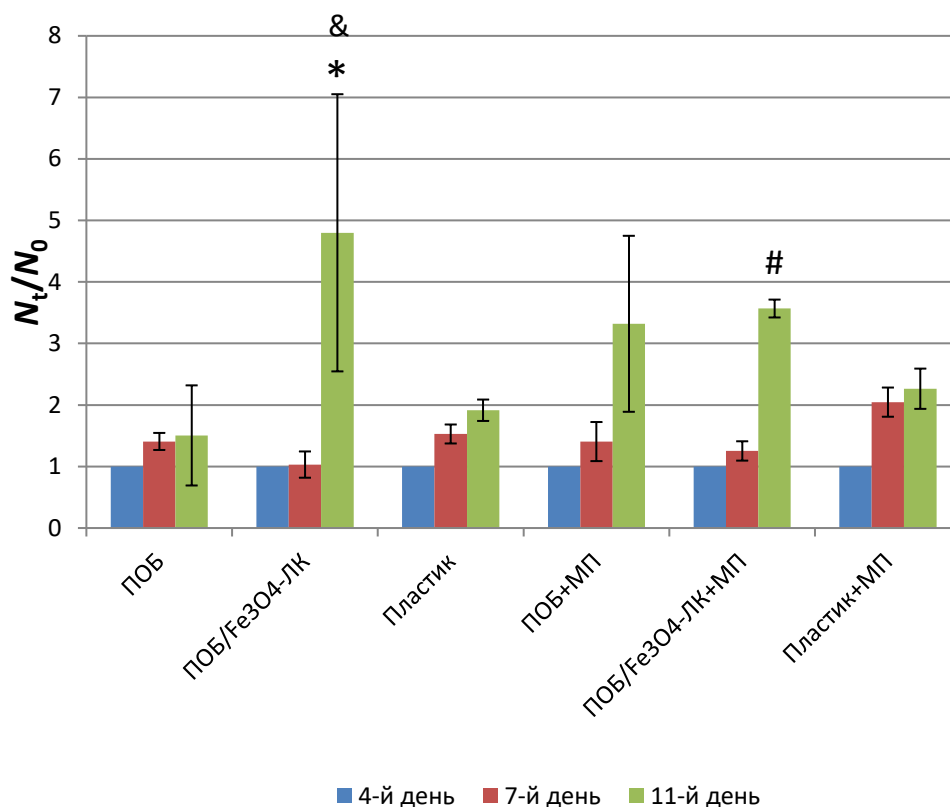


Рисунок 3.12 – Пролиферация МСК на исследуемых кондуитах под воздействием МП и без него: * $p < 0,05$ ПОБ/Fe₃O₄-ЛК (11-й день) vs. пластик (11-й день); & $p < 0,05$ ПОБ/Fe₃O₄-ЛК (11-й день) vs. ПОБ (11-й день); # $p < 0,05$ ПОБ/Fe₃O₄-ЛК+МП (11-й день) vs. пластик+МП (11-й день)

На рисунке 3.12 представлена пролиферация МСК на кондуитах из чистого ПОБ и с добавлением Fe₃O₄-ЛК на 4, 7 и 11 сутки инкубирования. Важно отметить, что в МП образцы помещались спустя 1 сутки после засева. Согласно рисунку 3.12, средние значения интенсивности флуоресценции увеличиваются с течением времени для каждого из исследуемых материалов, как под воздействием МП, так и без него. Это доказывает, что МСК выживают и растут на данных материалах. Эти результаты показывают, что кондуиты ПОБ и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК, как под воздействием МП, так и без него, биосовместимы и поддерживают клеточную адгезию и пролиферацию. Скорость пролиферации МСК на поверхности кондуита из чистого ПОБ сравнима с таковой на культуральном пластике. Более того, на 11 сутки среднее значение флуоресценции для образца ПОБ/Fe₃O₄-ЛК выше, чем в случае чистого ПОБ и пластика. Это указывает на то, что кондуиты ПОБ/Fe₃O₄-ЛК в большей степени поддерживают адгезию и пролиферацию МСК, что может быть связано с повышенной шероховатостью поверхности композита, установленной методами СЭМ и АСМ (Рисунки 3.3, д; 3.4, б, г; Таблица 3.2).

Влияние МП на пролиферацию МСК на поверхности различных материалов противоречиво: на 11 сутки в случае кондуита ПОб рост МСК, в среднем, увеличивается под воздействием МП, в то время как для ПОб/Fe₃O₄-ЛК наблюдается противоположный тренд. В литературе встречаются противоречивые данные относительно влияния МП на пролиферацию клеток, которое зависит от множества факторов, включая линию клеток, индукцию и режим воздействия МП [164-171]. Например, в исследовании [170] сообщается о негативном влиянии МП с индукцией свыше 30 мТл на пролиферацию макрофагов. Помимо этого, установлено негативное влияние МП 100 мТл на жизнеспособность и пролиферацию МСК человека [171].

В исследовании [168] оценивали влияние МП на пролиферацию и дифференцировку клеток MG63 на 10-й, 20-й и 30-й дни культивирования. В каждой временной точке было обнаружено снижение скорости пролиферации клеток, растущих в МП, по сравнению с клетками, инкубированными без МП. При этом скорость пролиферации снижается с увеличением индукции МП от 0 до 250 мТл. Авторы объясняют это наблюдение тем, что клетки при воздействии сильных МП находятся на стадии дифференцировки, а не пролиферации. Данное предположение подтверждается анализом активности щелочной фосфатазы, в ходе которого обнаружено, что клетки, стимулированные МП проявляют значительно более активную дифференцировку в сравнении с клетками, инкубированными без МП, и, следовательно, уже не участвуют в пролиферации.

Похожие результаты описаны в исследовании пролиферации и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BMSCs) на трёхмерном скэффолде Fe₂O₃/nHA/PLLA с применением переменного электромагнитного поля (ЭМП) и без него [169]. Исследование пролиферации не показывает значительной разницы между группами А (BMSCs на магнитных скэффолдах в ЭМП), В (BMSCs на магнитных скэффолдах) и С (контроль). Однако активность щелочной фосфатазы в группе А значительно превышает две другие группы, что свидетельствует о стимулирующем влиянии магнитных частиц в ЭМП на остеогенную дифференцировку, но не на пролиферацию.

В исследовании [166] установлено увеличение пролиферационной активности MC3T3-E1 с применением нанокompозита на основе PLGA и 0,5 мас. % МНЧ в МП в сравнении с чистым PLGA. Однако последующее увеличение концентрации магнитной фазы (до 1 и 5 мас. %) приводит к ухудшению пролиферации клеток. Это предположительно объясняется более быстрым переходом клеток от пролиферации к дифференцировке в случае культивирования на композитах с добавлением 1 и 5 мас. % МНЧ. Таким образом, клетки более активно участвуют в дифференцировке, что подтверждается активностью щелочной фосфатазы.

В исследовании [167] статистической разницы между скоростями пролиферации МСК на PCL и PCL/Fe₃O₄, при воздействии МП, так и без него, не обнаружено на 1, 4 и 7 сутки. Только на 14 сутки наблюдается ускоренная пролиферация в группах PCL/Fe₃O₄ и PCL/Fe₃O₄ в МП.

Морфология МСК на поверхности исследуемых кондуитов оценивалась методом СЭМ (Рисунок 3.13). На каждом из материалов клетки проявляют распластанную морфологию с наибольшим числом клеток в случае композитного кондуита ПОб/Fe₃O₄-ЛК, что подтверждает результаты теста с резазурином (Рисунок 3.12).

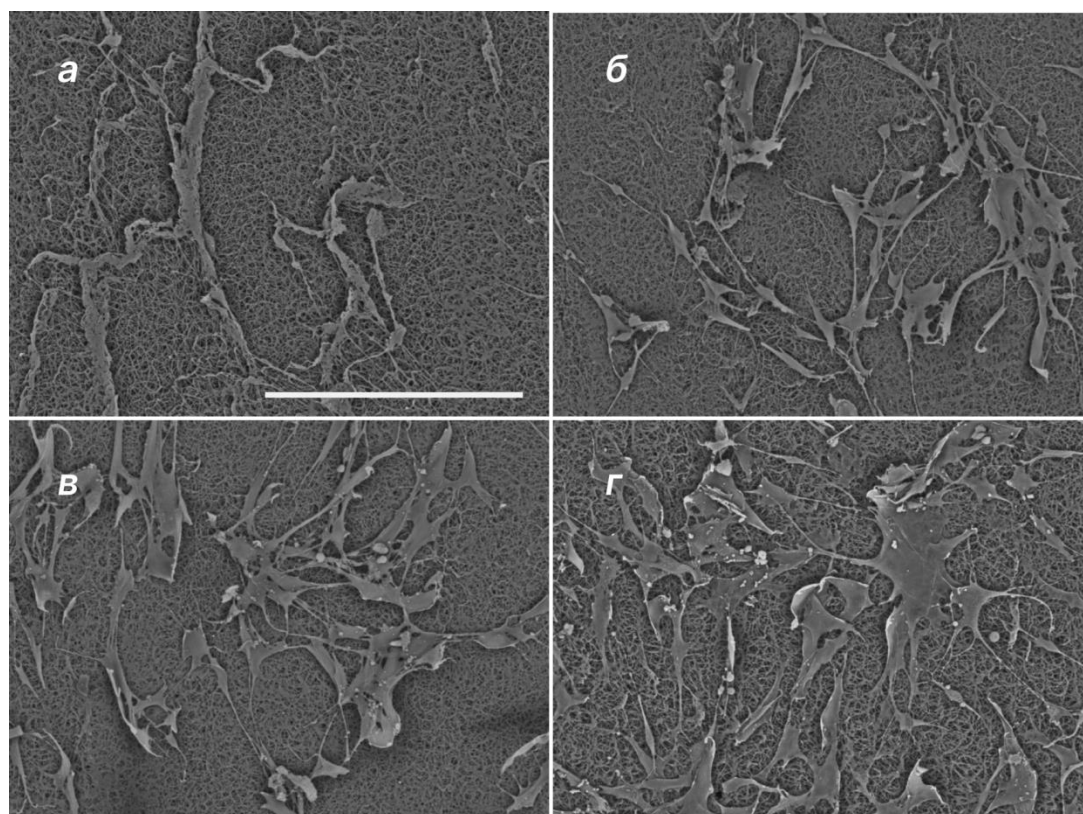


Рисунок 3.13 – МСК, растущие на поверхности кондуитов из чистого ПОб (а–б) и ПОб/Fe₃O₄-ЛК (в–г). Масштабная линейка соответствует 200 мкм

3.3.2 Оценка пролиферации нейробластомы SH-SY5Y на кондуитах *in vitro*

Помимо экспериментов с МСК, для исследования биосовместимости и биоактивности кондуитов была проведена оценка пролиферации культуры нейробластомы человека SH-SY5Y. Данные клетки могут дифференцироваться в зрелый нейроноподобный фенотип, характеризующийся нейрональными маркерами [172]. В недифференцированной форме клетки SH-SY5Y морфологически характеризуются нейробластоподобными неполяризованными клеточными телами с небольшим числом усеченных отростков. Клетки SH-SY5Y имеют тенденцию образовывать скопления и расти друг над другом в

центре клеточной массы. Недифференцированные клетки SH-SY5Y непрерывно пролиферируют и экспрессируют незрелые нейронные маркеры. После обработки агентами, индуцирующими дифференцировку, клетки SH-SY5Y морфологически напоминают первичные нейроны с длинными тонкими отростками. Дифференцировка клеток SH-SY5Y вызывает снижение скорости пролиферации, поскольку клетки выводятся из клеточного цикла [172].

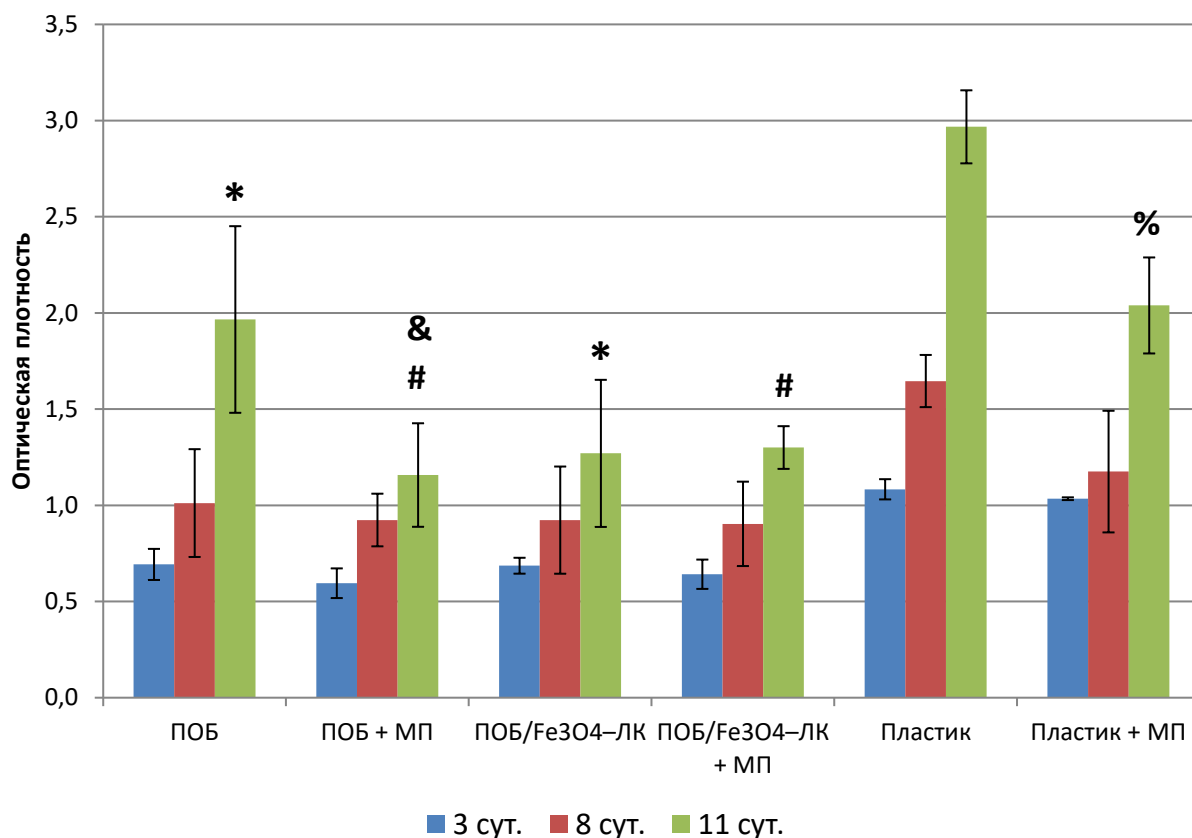


Рисунок 3.14 – Пролиферация SH-SY5Y на исследуемых кондуитах под воздействием МП и без него: * $p < 0,05$ ПОБ и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК (11-й день) vs. пластик (11-й день); # $p < 0,05$ ПОБ+МП и ПОБ/Fe₃O₄-ЛК+МП (11-й день) vs. пластик+МП (11-й день); & $p < 0,05$ ПОБ+МП (11-й день) vs. ПОБ (11-й день); % $p < 0,05$ пластик+МП (11-й день) vs. пластик (11-й день)

На рисунке 3.14 представлены результаты ХТТ-теста на 3, 8 и 11 сутки культивирования SH-SY5Y на поверхности исследуемых кондуитов. Каждый из исследуемых материалов, вне зависимости от применения МП, поддерживает адгезию, выживание и пролиферацию SH-SY5Y, что еще раз подтверждает биосовместимость кондуитов. Скорость пролиферации SH-SY5Y снижается для композитного кондуита ПОБ/Fe₃O₄-ЛК в сравнении с чистым ПОБ, что отличается от данных эксперимента с МСК

(Рисунок 3.12). Применение низкочастотного МП также снижает пролиферацию нейробластомы как на поверхности кондуита из чистого ПОБ, так и на культуральном пластике. В отличие от этого, пролиферация клеток на кондуите ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК не подавляется при внесении их в МП. Вероятно, данный материал во внешнем МП оказывает магнитомеханическую стимуляцию роста клеток [8, 24, 25], которая компенсирует негативное воздействие низкочастотного МП.

Для визуализации морфологии SH-SY5Y и их взаимодействия с волокнами в кондуитах была проведена СЭМ (Рисунок 3.15). На каждом из исследуемых материалов клетки проявляют распластанную морфологию с отростками, вытянутыми вдоль волокон во всех направлениях. Однако некоторые клетки имеют вытянутую биполярную форму. По данным литературы, клетки SH-SY5Y обладают неполяризованными клеточными телами в недифференцированной форме, в то время как в ходе дифференцировки они вытягиваются, удлиняются и приобретают продолговатую форму с длинными отростками. Таким образом, можно предположить, что часть клеток на поверхности волокон переходит в стадию дифференцировки. СЭМ позволила подтвердить, что клетки SH-SY5Y способны прикрепляться и расти на поверхности кондуитов ПОБ и ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК, причем наибольшее число клеток обнаружено на образцах из чистого ПОБ.

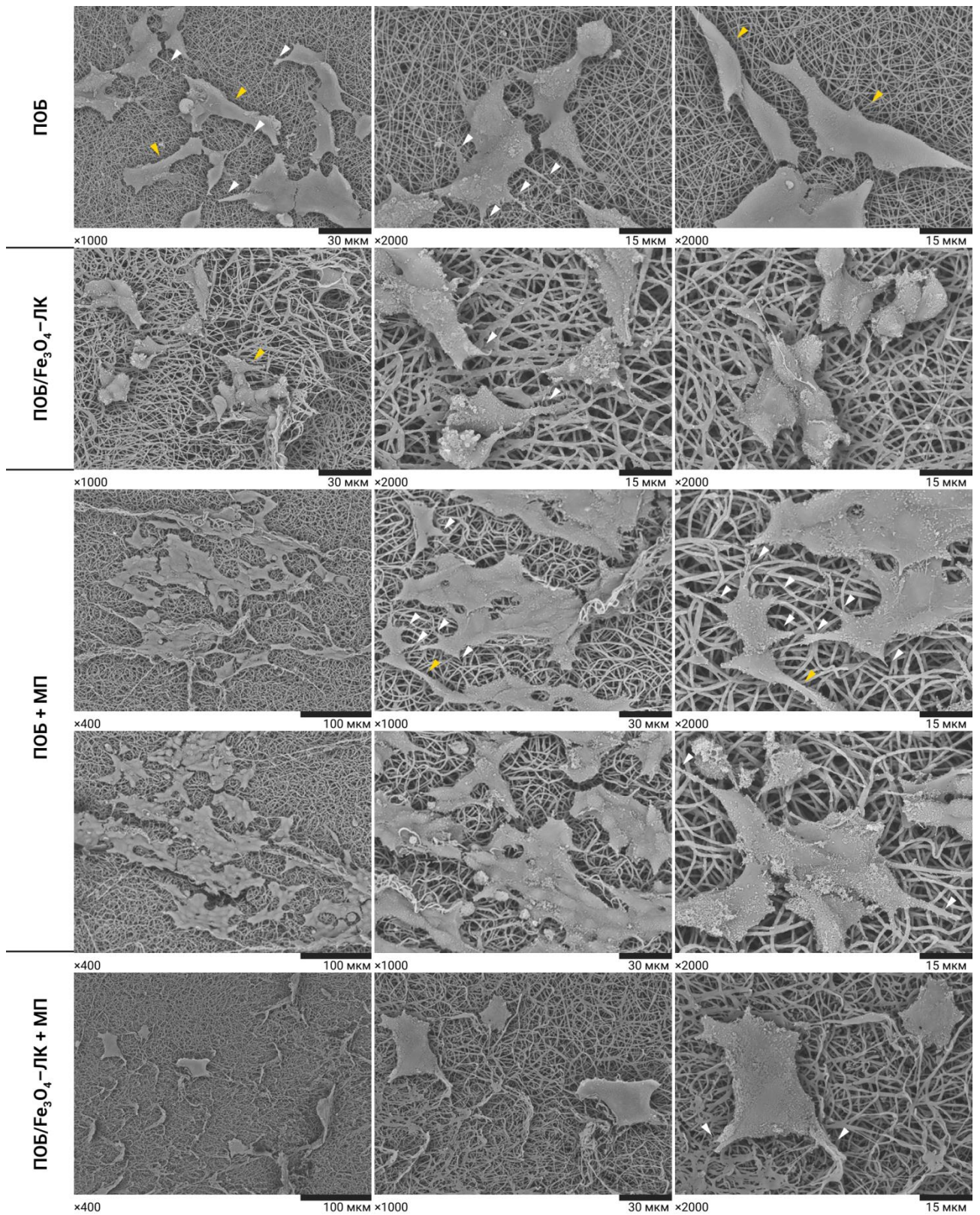


Рисунок 3.15 – Снимки СЭМ нейробластомы SH-SY5Y на поверхности исследуемых кондуитов. Белые стрелки указывают на клеточные отростки; желтые стрелки указывают на клетки с вытянутой продолговатой морфологией

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

Группа	ФИО
9ДМ11	Шлапаковой Ладе Евгеньевне

Школа	ИШХБМТ	Отделение школы (НОЦ)	-
Уровень образования	магистратура	Направление/специальность	18.04.01 Химическая технология

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

1. <i>Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих</i>	<i>Бюджет проекта – не более 5 млн руб., в т.ч. затраты по оплате труда – не более 2 млн руб.</i>
2. <i>Нормы и нормативы расходования ресурсов</i>	<i>В соответствии с ГОСТ 14.322-83 «Нормирование расхода материалов» – норма амортизации: 0,15; – районный коэффициент: 1,3; – накладные расходы: 16 %</i>
3. <i>Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования</i>	<i>1. Налоговый кодекс Российской Федерации 2. ФЗ №212 от 24.07.2009 в ред. от 19.12.2016 Коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды: 30,2 %.</i>

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. <i>Оценка коммерческого и инновационного потенциала НИИ</i>	<i>Определение потенциальных потребителей результатов исследования, анализ конкурентных технических решений. SWOT-анализ.</i>
2. <i>Разработка устава научно-технического проекта</i>	<i>Определение состава, трудоемкости и продолжительности проведения научного исследования. Составление графика проведения исследования. Формирование бюджета научного исследования.</i>

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

1. Сегментирование рынка
2. Оценка конкурентоспособности технических решений
3. Матрица SWOT
4. График проведения и бюджет НИИ

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	14.03.2023
---	-------------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент ОСГН ШБИП ТПУ	Маланина Вероника Анатольевна	к.э.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Шлапакова Лада Евгеньевна		

В выпускной квалификационной работе разработаны магнитоактивные композитные материалы для восстановления повреждений периферической нервной системы (ПНС), которые представляют собой полые трубки с пористой микроволокнистой структурой (кондуиты). Кондуиты изготовлены методом электроформования полимера; их морфология, структура, химический состав, физико-механические и магнитные свойства исследованы различными физико-химическими методами. Помимо этого, изучены биологические свойства разработанных материалов *in vitro* и *in vivo*.

4.1 Предпроектный анализ

4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Данная работа нацелена на разработку и исследование свойств магнитоактивных композитных кондуитов для восстановления дефектов периферических нервов. Для анализа потребителей результатов исследования необходимо рассмотреть целевой рынок и провести его сегментирование. Сегментирование – это разделение покупателей на однородные группы, для каждой из которых может потребоваться определенный товар (услуга).

Потенциальными потребителями НИР в основном являются юридические лица. К ним относятся, прежде всего, медицинские учреждения, как государственные, так и частные. Также разработанные материалы могут приобретаться организациями, которые ведут научно-исследовательскую деятельность (вузы, НИИ и т.п.), для проведения исследований в области регенеративной медицины. Кроме того, потребителями могут быть физические лица, а именно пациенты с травмами ПНС. Карта сегментирования рынка по области применения и доли рынка сбыта продукции приведена на таблице 4.1. Потенциальными потребителями выбраны частные клиники.

Таблица 4.1 – Карта сегментирования рынка по области применения разработки

Область рынка сбыта	Доля рынка, %
Частные клиники	45
Государственные больницы	40
Пациенты с травмами ПНС	10
Вузы, НИИ	5

4.1.2 Анализ конкурентных технических решений

Анализ разработок конкурентов необходимо проводить систематически, так как рынок находится в постоянном движении. Сравним предлагаемый материал для восстановления периферических нервов с существующими подходами к терапии данного вида травм. В литературе при оценке эффективности регенерации нервов предлагаемые кондуиты принято сравнивать с аутотрансплантатами [28, 30, 33, 38, 39, 72, 77]. На данный момент аутотрансплантация считается «золотым стандартом» восстановления периферических нервов и предполагает забор здорового нерва с нормальными функциями из любой подвижной конечности пациента и его трансплантацию в область поврежденного нерва. Данный подход имеет ряд ограничений, среди которых нехватка донорских нервов, их неподходящий размер, риск инфекций, возможность образования нейромы, необходимость повторных операций [3, 4]. Более того, аутотрансплантация нерва предполагает травмирование здорового донорского нерва, что может привести к потере двигательной и сенсорной функций конечностей [1].

В качестве второго конкурентного решения примем коммерчески доступные кондуиты NeuraGen 3D компании Integra LifeSciences [173], одобренные в 2014 г. Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (*англ.* Food and Drug Administration, FDA). По результатам клинических испытаний данных кондуитов, была достигнута хорошая степень восстановления периферических нервов, однако данный материал обладает сравнительно сложной и дорогостоящей технологией изготовления. Оценим конкурентные разработки по выбранным техническим и экономическим критериям по пятибалльной шкале. Результат анализа сведен в таблицу 4.2. В таблице B_{ϕ} обозначено разрабатываемое решение, B_{k1} , B_{k2} – конкурентные технические решения (аналоги).

Конкурентоспособность сравниваемых решений K_i рассчитывается по формуле:

$$K_i = \sum V_i B_i, \quad (4.1)$$

где V_i – вес i -ого показателя; B_i – балл i -ого показателя.

Таблица 4.2 – Оценочная карта конкурентных методов восстановления дефектов периферических нервов

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Б _ф	Б _{к1}	Б _{к2}	К _ф	К _{к1}	К _{к2}
Технические критерии оценки ресурсоэффективности							
1 Эффективность стимуляции восстановления нерва	0,20	4	3	4	0,80	0,60	0,80
2 Биосовместимость с окружающими тканями	0,20	5	5	5	1,00	1,00	1,00
3 Безопасность для других органов	0,15	5	1	5	0,75	0,15	0,75
4 Доступность сырья	0,05	5	1	4	0,25	0,05	0,2
5 Простота изготовления	0,05	4	2	3	0,20	0,10	0,15
6 Подходящие механические свойства	0,10	4	5	4	0,40	0,50	0,40
7 Возможность варьировать размер	0,10	5	1	4	0,50	0,10	0,40
Экономические критерии оценки эффективности							
1 Цена	0,10	4	5	3	0,40	0,50	0,30
2 Уровень проникновения на рынок	0,05	1	5	3	0,05	0,25	0,15
Итого	1,00	37	28	35	4,35	3,25	4,15

Исходя из данных таблицы 4.2, разработанное решение более конкурентоспособно в сравнении с конкурентами.

4.1.3 SWOT-анализ

Для исследования внешней и внутренней среды проекта проводится комплексный анализ SWOT. Первый этап анализа заключается в выявлении сильных и слабых сторон проекта (внутренняя среда), а также возможностей и угроз для проекта, которые могут возникнуть во внешней среде. Второй этап состоит в выявлении соответствия сильных и слабых сторон проекта внешним условиям окружающей среды. Результатом третьего этапа является матрица SWOT-анализа (Таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Матрица SWOT-анализа

	<p>Сильные стороны проекта:</p> <p>C1 Обширный литературный обзор: предлагаемый материал сочетает лучшие качества существующих разработок и исключает их недостатки;</p> <p>C2 Эффективная регенерация нервов за счет магнитомеханической стимуляции;</p> <p>C3 Сравнительно простые технологии получения материалов;</p> <p>C4 Доступность сырья;</p> <p>C5 Экологичное производство;</p> <p>C6 Биосовместимость и биоразлагаемость кондуитов;</p> <p>C7 Гибкие и прочные механические свойства материала;</p> <p>C8 Новый состав кондуитов, не имеющий аналогов.</p>	<p>Слабые стороны проекта:</p> <p>Сл1 Вредные и опасные факторы: высокое электрическое напряжение, токсичные и горючие растворители, повышенный шум и вибрация;</p> <p>Сл2 Сложность масштабирования технологии.</p>
<p>Возможности:</p> <p>V1 Персонализированное изготовление кондуитов под конкретный дефект;</p> <p>V2 Поиск путей автоматизации и масштабирования производства;</p> <p>V3 Сотрудничество с российскими и зарубежными специалистами в области регенерации нервов;</p> <p>V4 Привлечение в проект перспективных студентов/аспирантов/ научных сотрудников;</p> <p>V5 Получение дополнительного финансирования проекта;</p> <p>V6 Проведение доклинических и клинических испытаний;</p> <p>V7 Оформление патента;</p> <p>V8 Расширение областей применения изделия;</p> <p>V9 Выход на зарубежный рынок;</p> <p>V10 Совершенствование оборудования и методов безопасной работы</p>	<p>Высокая эффективность разработанных материалов в регенерации нервов поможет получить дополнительное финансирование проекта; выйти на этап клинических испытаний; зарегистрировать патент; выйти на зарубежный рынок. Помимо этого, успех предложенных материалов поможет привлечь в проект полезные сотрудничества и новых исполнителей для дальнейшего совершенствования разработки.</p>	<p>Для минимизации воздействия вредных и опасных условий труда необходимо повышение безопасности оборудования, совершенствование методов безопасной работы и средств индивидуальной защиты. Помимо этого, важной задачей на будущее является поиск путей автоматизации и масштабирования производства, т.к. на данном этапе разработки возможно только получение лабораторных образцов.</p>

Продолжение таблицы 4.3

Угрозы: У1 Высокая конкуренция; У2 Поломка оборудования; У3 Поражение электрическим током; У4 Выявление у пациентов нежелательных побочных эффектов; У5 Нехватка финансовых/материальных/трудовых ресурсов	Несмотря на большое число российских и зарубежных разработок материалов для регенерации нервной ткани, предлагаемое изделие конкурентоспособно за счет принципиально нового состава, не имеющего аналогов на рынке. Вероятность нежелательных побочных эффектов при правильном применении предлагаемых кондуитов минимальна за счет использования биосовместимого сырья природного происхождения.	Конкурентные разработки с более масштабным производством могут стать существенной угрозой для проекта. Во избежание поражения электрическим током и воздействия других вредных и опасных на исполнителей проекта необходимо строгое соблюдение техники безопасности.
---	---	--

4.2 Планирование научного исследования

Планирование научного исследования осуществляется в следующем порядке:

- определение структуры работ научного исследования;
- установление продолжительности работ;
- построение графика проведения научного исследования.

4.2.1 Структура работ научного исследования

Для выполнения научных исследований формируется рабочая группа, в состав которой могут входить научные сотрудники и преподаватели, инженеры, техники и лаборанты, численность групп может варьироваться. По каждому виду запланированных работ устанавливается соответствующая должность исполнителей. Перечень этапов и работ, распределение исполнителей по данным видам работ приведен в таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Структура работ научного исследования

Основные этапы	№	Содержание работ	Исполнители
Разработка технического задания	1	Составление и утверждение технического задания	Магистрант (М), научный руководитель (Р)
Выбор направления исследования	2	Поиск литературы по теме	Магистрант
	3	Изучение и анализ литературы	Магистрант
	4	Выбор состава, структуры, геометрических параметров кондуитов	Магистрант, научный руководитель
	5	Планирование исследования, составление календарного графика	Магистрант, научный руководитель
Разработка и изучение изделия	6	Оптимизация параметров процесса изготовления кондуитов	Магистрант
	7	Получение лабораторных образцов	Магистрант
	8	Исследование физико-химических свойств кондуитов	Магистрант, научный сотрудник (НС), доцент (Д), 2 инженера (И), ТМЦКП ¹
	9	Биологическая оценка материалов	Магистрант, научный сотрудник
Обобщение и оценка результатов	10	Обработка, анализ, описание экспериментальных данных; сравнение с литературными данными	Магистрант, научный руководитель
Оформление комплекта документации ВКР	11	Составление пояснительной записки и презентации	Магистрант

4.2.2 Определение продолжительности работ

Трудоемкость выполнения научного исследования оценивается экспертным путем в человеко-днях и носит вероятностный характер:

$$t_{ож,i} = \frac{3t_{min,i} + 2t_{max,i}}{5}, \quad (4.2)$$

где $t_{ож,i}$, $t_{min,i}$, $t_{max,i}$ – соответственно ожидаемая, минимальная, максимальная трудоемкости i -ой работы, человеко-дни.

Продолжительность i -ой работы в рабочих днях $T_{p,i}$ определяется по формуле:

$$T_{p,i} = \frac{t_{ож,i}}{Ч_i}, \quad (4.3)$$

где $Ч_i$ – численность исполнителей i -ой работы, человек.

¹ Томский материаловедческий центр коллективного пользования

4.2.3 Разработка графика проведения научного исследования

При планировании научного исследования удобно строить ленточный график проведения работ в форме диаграммы Ганта. Работы представляются отрезками, указывающими даты начала и окончания данного вида работ. Для построения графика продолжительность работ из рабочих дней ($T_{p,i}$) переводят в календарные дни ($T_{k,i}$) по формуле:

$$T_{k,i} = T_{p,i}k_{\text{кал}}, \quad (4.4)$$

где $k_{\text{кал}}$ – коэффициент календарности, определяемый по формуле:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}}, \quad (4.5)$$

где $T_{\text{кал}}$, $T_{\text{вых}}$, $T_{\text{пр}}$ – соответственно, количество календарных, выходных и праздничных дней в году.

Результаты расчета округлим до целого числа и сведем в таблицу 4.5. График проведения работ с разбивкой по месяцам и декадам и указанием исполнителей представлен в таблице 4.6.

Таблица 4.5 – Временные показатели проведения научного исследования

Наименование работы	Трудоемкость работ, человеко-дни			Исполнители	$T_{p,i}$	$T_{k,i}$
	$t_{\text{min},i}$	$t_{\text{max},i}$	$t_{\text{ож},i}$			
Составление и утверждение технического задания	6	7	6,4	Магистрант, научный руководитель,	3,2	5
Поиск литературы по теме	3	4	3,4	Магистрант	3,4	5
Изучение и анализ литературы	4	5	4,4	Магистрант	4,4	7
Выбор состава, структуры, геометрических параметров кондуитов	4	5	4,4	Магистрант, научный руководитель	2,2	3
Планирование исследования, составление календарного графика	5	6	5,4	Магистрант, научный руководитель	2,7	4
Оптимизация параметров процесса изготовления кондуитов	28	34	30,4	Магистрант	30,4	45
Получение лабораторных образцов	18	24	20,4	Магистрант	20,4	30
Исследование физико-химических свойств кондуитов	170	200	182	Магистрант, научный сотрудник, доцент, 2 инженера, ТМЦКП	30,3	45
Биологическая оценка материалов	65	72	67,8	Магистрант, научный сотрудник	33,9	50
Оценка эффективности полученных результатов	40	48	43,2	Магистрант, научный руководитель	21,6	32
Составление пояснительной записки и презентации	18	24	20,4	Магистрант	20,4	30
Итого	361	429	388,2		172,9	256

Таблица 4.6 – Календарный план-график проведения научного исследования

№ работ	Исполнитель	Т _{к.б} , дней	Продолжительность выполнения работ																										
			сентябрь			октябрь			ноябрь			декабрь			январь		февраль			март			апрель			май			
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1	М, Р	5	■																										
2	М	5		■																									
3	М	7			■																								
4	М, Р	3				■																							
5	М, Р	4					■																						
6	М	45				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
7	М	30								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
8	М, НС, Д, И, ТМЦКП	45												■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
9	М, НС	50																											
10	М, Р	32																											
11	М	30																											

- – магистрант (М);
- ▨ – научный руководитель (Р);
- ▩ – ТМЦКП ТГУ;
- ▧ – научный сотрудник (НС);
- ▨ – инженер (И);
- ▤ – доцент (Д)

4.3 Формирование бюджета научного исследования

При формировании бюджета научного исследования учитывают следующие статьи расходов:

- материальные затраты;
- затраты на оборудование;
- основная заработная плата исполнителей темы;
- дополнительная заработная плата исполнителей темы;
- отчисления во внебюджетные фонды;
- накладные расходы.

4.3.1 Расчет материальных затрат

В эту статью включаются затраты на приобретение всех видов материалов, комплектующих изделий и полуфабрикатов, необходимых для выполнения работ по данной теме. Количество потребных материалов определяется по нормам расхода.

Расчет стоимости материальных затрат производится по действующим прейскурантом компаний-поставщиков. В стоимость материальных затрат включают транспортные расходы (3 % от цены). В эту же статью включаются затраты на оформление документации (канцелярские принадлежности, тиражирование материалов)

Расчет материальных затрат (Z_m) ведется по следующей формуле:

$$Z_m = \sum C_i N_i, \quad (4.6)$$

где C_i – цена i -ого вида материальных ресурсов; N_i – количество i -ого вида материальных ресурсов.

Расчет материальных затрат представлен в таблице 4.7. Значения цен взяты с сайтов организаций-поставщиков. Согласно таблице, расходы на материалы составили 70 429,73 рублей.

Таблица 4.7 – Сырье, материалы, комплектующие изделия и покупные полуфабрикаты

Наименование	Единица	Количество	Цена за единицу, руб	Сумма, руб.
Железо (III) хлорное 6-водное Ч	кг	0,025	400,00	10,00
Железо сернокислое 7-водный (II) ХЧ	кг	0,01	690,00	6,90
Аммиак водный ЧДА	л	0,1	163,00	16,30
Лимонная кислота 1-водная ХЧ	кг	0,01	670,00	6,70
Этанол абсолютный ХЧ	л	1	225,00	225,00
Ацетон ХЧ	кг	0,2	341,25	68,25
Хлороформ ХЧ	кг	0,3	1392,00	417,60
Шприц 5 мл 2-х компонентный с иглой 22g	упаковка 100 шт.	0,5	1020,00	510,00

Продолжение таблицы 4.7

Удлинитель медицинский (инфузионная линия) "МИМ", Россия	шт.	50	23,50	1175,00
Иглы Fisanar G27	шт.	100	71,76	7176,00
Спицы стальные ø 2 мм	набор 5 шт.	1	138,00	138,00
Безволоконные салфетки Kimtech Kimwipes	упаковка 180 шт.	1	330,00	330,00
Крепления для физико-механических испытаний	комплект	1	6500,00	6500,00
Среда «Альфа-МЕМ» без глутамина «ПанЭко»	бутылка 450 мл	1	662,00	662,00
Среда DMEM/F12 без глутамина «ПанЭко»	бутылка 450 мл	1	584,40	584,40
Фетальная бычья сыворотка	фасовка 50 мл	2	9944,15	19888,30
Пенициллин-стрептомицин, 100-кратный лиофилизированный "ПанЭко"	пенициллинка 5 мл	2	82,62	165,24
Таблетки фосфатно-солевого буфера pH 7.4	1 таблетка	10	11,40	114,00
Набор для оценки пролиферации клеток Alamar Blue	фасовка 10 мл	1	9457,48	9457,48
Набор для оценки пролиферации клеток ХТТ	набор на 1000 измерений	0,2	55128,00	11025,60
Раствор трипсина 0,25% «ПанЭко»	бутылка 50 мл	1	182,60	182,60
Формалин	бутылка 1 л	0,01	600,00	6,00
Глутаровый альдегид, 25% р-р Panreac	бутылка 1 кг	0,01	9212,00	92,12
Планшет культуральный 96-луночный	упаковка 100 шт.	0,1	12142,00	1214,20
Чашка Петри культуральная ø10 см	упаковка 20 шт.	0,5	650,00	325,00
Пробирка типа Фалькон 50 мл	упаковка 25 шт.	0,4	696,00	278,40
Пробирка типа Фалькон 15 мл	упаковка 25 шт.	1	609,00	609,00
Пипетка серологическая 10 мл	упаковка 200 шт.	0,5	3627,00	1813,50
Пипетка серологическая 25 мл	упаковка 200 шт.	0,2	6682,00	1336,40
Наконечник для дозатора 200 мкл	упаковка 960 шт.	0,5	435,00	217,50
Наконечник для дозатора 1 мл	упаковка 480 шт.	0,5	2001,00	1000,50
Пробирки центрифужные 1,5 мл	упаковка 500 шт.	1	489,60	489,60
Всего за материалы				66041,59
Транспортно-заготовительные расходы (3 %)				1981,25
Итого по статье С _м				68022,84

4.3.2 Расчет затрат на специальное оборудование для научных работ

В данную статью включается стоимость приборов, измерительной аппаратуры, химической посуды, необходимых для проведения исследования. Данные о ценах берутся из соответствующих каталогов, размещенных в интернете. При проведении исследований в рамках ВКР оборудование не приобреталось, а использовалось оборудование, имеющееся в лабораториях ТПУ, ТГУ и МГУ. Поэтому расходы по данной статье следует учитывать в виде амортизационных отчислений:

$$Z_{об} = k_{аморт} \cdot \sum C_i N_i, \quad (4.7)$$

где $k_{аморт}$ – годовая норма амортизации, равная 0,15.

C_i – цена i -ого вида оборудования, руб./шт.;

N_i – количество i -ого вида оборудования, шт.

Расчет затрат на оборудование для двух серий опытов приведен в таблице 4.8. Расчет амортизационных отчислений осуществляется с учетом срока эксплуатации каждого наименования оборудования в месяцах.

Таблица 4.8 – Затраты на оборудование для проведения экспериментов

Наименование	Количество, шт.	Цена, руб.	Стоимость, руб.	Амортизационные отчисления, руб./год	Срок эксплуатации, мес.	Амортизационные отчисления, руб.
Колба трехгорлая, 500 мл	1	2200	2200	330	1	27,50
Переходник Насадка Вюрца	1	3570	3570	535,5	1	44,63
Аллонж	1	480	480	72	1	6,00
Стакан лабораторный, 500 мл, градуированный	2	250	500	75	1	6,25
Колбонагреватель LOIP LH-150, 500 мл	1	25106	25106	3765,9	1	313,83
Аквадистиллятор Liston A1204	1	44000	44000	6600	6	3300,00
Вытяжной шкаф	1	54071	54071	8110,65	6	4055,33
Набор якорей для магнитной мешалки	1	500	500	75	1	6,25
Дозатор 1-канальный механический 20-200 мкл	1	12007	12007	1801,05	6	900,53
Дозатор 1-канальный механический 100-1000 мкл	1	11300	11300	1695	6	847,50
Смеситель ротационный для пробирок RM-1L	1	47319	47319	7097,85	3	1774,46
Аналитические весы CAUX-120	1	155630	155630	23344,5	6	11672,25
Ультразвуковая ванна Stegler 10DT	1	54 863	54863	8229,45	3	2057,36
Дозатор медицинский	1	30900	30900	4635	3	1158,75
Токарный станок по дереву Энкор Корвет-73	1	15665	15665	2349,75	3	587,44
Генератор электрического тока	1	200000	200000	30000	3	7500,00
Стальной вал 20 мм	1	316,8	316,8	47,52	3	11,88
Сканирующий электронный микроскоп	1	19858859	19858859	2978828,85	1	248235,74
Спектрометр комбинационного рассеяния NT MDT	1	10000000	10000000	1500000	1	125000,00

Продолжение таблицы 4.8

Рентгеновский фотоэлектронный спектрометр Thermo Fisher Scientific XPS NEXSA	1	95000000	95000000	14250000	1	1187500,00
Дифференциальный сканирующий калориметр DSC 2920	1	478962	478962	71844,3	1	5987,03
Цифровой углометр Drop Shape Analysis System DSA25	1	1983060	1983060	297459	1	24788,25
Автоклав	1	720736,32	720736,3	108110,448	2	18018,41
Ламинарный бокс БМБ-II-«Ламинар-С»-1,8	1	853 200	853200	127980	2	21330,00
Микроскоп биологический Микромед 1	1	48340	48340	7251	2	1208,50
Микробиологический инкубатор Binder	1	148951,39	148951,4	22342,7085	2	3723,78
Центрифуга Eppendorf 5810 R	1	725792,08	725792,1	108868,812	2	18144,80
ПК DEXP Aquilon O274	5	11699	58495	8774,25	9	6580,69
Монитор DEXP DF22N1	5	6799	33995	5099,25	9	3824,44
Многофункциональное устройство лазерное HP LaserJet M141a	1	19499	19499	2924,85	9	2193,64
Клавиатура проводная Aceline	5	299	1495	224,25	9	168,19
Мышь проводная Aceline	5	99	495	74,25	9	55,69
Итого по статье С _о						1701029,09

4.3.3 Расчет заработной платы

В данной статье расходов рассчитывается заработная плата работников ($Z_{зп}$), включая премии и доплаты, а также дополнительную заработную плату:

$$Z_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}, \quad (4.8)$$

где $Z_{осн}$ и $Z_{доп}$ – соответственно основная и дополнительная заработная плата, руб.

Для расчёта основной заработной платы $Z_{осн}$ используется формула:

$$Z_{осн} = Z_{дн} T_p, \quad (4.9)$$

где $Z_{дн}$ – среднедневная заработная плата одного работника, руб.;

T_p – продолжительность работ, выполняемых работником, рабочих дней.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m M}{F_d}, \quad (4.10)$$

где Z_m – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года: при отпуске в 28 раб. дня $M = 11,15$ месяца, 6-дневная неделя;

F_d – количество рабочих дней в году.

Должностной оклад работника Z_m за месяц рассчитывается по формуле:

$$Z_m = Z_{тс} \cdot k_p, \quad (4.11)$$

где $Z_{тс}$ – заработная плата согласно тарифной ставке, руб.;

k_p – районный коэффициент, равный 1,3 для Томска.

Дополнительная заработная плата предусматривает доплаты за отклонение от нормальных условий труда, гарантии и компенсации. Рассчитывается по формуле:

$$Z_{доп} = Z_{осн} \cdot k_{доп}, \quad (4.12)$$

где $k_{доп}$ – коэффициент дополнительной заработной платы, равный 0,12.

Расчет основной и дополнительной заработной платы исполнителей научного исследования представлен в Таблице 4.9. Заработная плата по тарифной ставке ($Z_{тс}$) магистранта и двух инженеров-исследователей ТПУ взята из приказа о приеме на работу Шлапаковой Л.Е. Приблизительные заработные платы (Z_m) научного руководителя, научного сотрудника и доцента ТПУ (с учетом районного коэффициента) взяты с сайта Экономического управления ТПУ [174].

Таблица 4.9 – Расчет заработной платы

Исполнители	З _{тс} , руб.	к _р	З _м , руб.	З _{дн} , руб.	Т _р , раб. дней	З _{осн} , руб.	З _{доп} , руб.	З _{осн} +З _{доп} , руб.
Магистрант	24800	1,3	32240	1641,44292	182	298742,612	35849,11	334591,7
Научный руководитель	110296	1,3	143384,8	7300,18502	27	197104,996	23652,6	220757,6
Инженер	24800	1,3	32240	1641,44292	15	24621,6438	2954,597	27576,24
Инженер	24800	1,3	32240	1641,44292	15	24621,6438	2954,597	27576,24
Научный сотрудник	100625,308	1,3	130812,9	6660,10884	65	432907,074	51948,85	484855,9
Доцент	81374,4615	1,3	105786,80	5385,94895	20	107718,979	12926,28	120645,3
Итого						1085716,95	130286	1216003

4.3.4 Расчет отчислений во внебюджетные фонды

Отчисления во внебюджетные фонды (З_{внеб}) определяются по формуле:

$$Z_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}), \quad (4.13)$$

где $k_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд ОМС, и социальное страхование). В ТПУ составляет 30,2 %. Отчисления во внебюджетные фонды представлены в таблице 4.10.

Таблица 4.10 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнители	З _{осн} +З _{доп} , руб.	к _{внеб}	З _{внеб} , руб.
Магистрант	334591,7	0,302	101046,7
Научный руководитель	220757,6	0,302	66668,8
Инженер	27576,24	0,302	8328,024
Инженер	27576,24	0,302	8328,024
Научный сотрудник	484855,9	0,302	146426,5
Доцент	120645,3	0,302	36434,88
Итого	1216003		367232,9

4.3.5 Научные и производственные командировки

В ходе данного исследования было две командировки (практики) магистранта в Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (Москва) в периоды с июня по июль 2022 г. и с февраля по апрель 2023 г. Сметы расходов на указанные командировки (Таблица 4.11) взяты из соответствующих приказов о направлении на практику обучающегося.

Таблица 4.11 – Расходы на командировки магистранта

Даты	Расходы, руб.			Всего
	Суточные	Проезд	Найм жилья	
С 27.06.2022 г. по 23.07.2022 г.	1350	14000	14850	30200
С 06.02.2023 г. по 20.04.2023 г.	3700	19000	40700	63400
Итого	5050	33000	55550	93600

4.3.6 Стоимость контрагентных работ

В данной работе часть исследований проводилось на платной основе в Томском региональном центре коллективного пользования ТГУ. Расходы, связанные с этими работами, представлены в таблице 4.12.

Таблица 4.12 – Расходы на платные исследования

Услуга	Единица	Цена за единицу, руб.	Количество	Стоимость, руб.
Физико-механические испытания полимерных материалов	час	2880	5	14400
Рентгеноструктурный анализ	образец	3990	4	15960
Проведение структурных исследований методом растровой электронной микроскопии	образец	4200	2	8400
Исследование твердых образцов методом синхронного термического анализа	час	3100	2	6200
			Итого	44960

4.3.7 Расчет накладных расходов

Накладные расходы ($Z_{\text{накл}}$) учитывают затраты, не вошедшие в предыдущие статьи расходов: печать и ксерокопирование материалов исследования, оплата услуг связи, электроэнергии, почтовые и телеграфные расходы, размножение материалов и т.д. Рассчитываются следующей формуле:

$$Z_{\text{накл}} = k_{\text{нр}} \cdot (\text{сумма статей 1} \div 6), \quad (4.14)$$

где $k_{\text{нр}}$ – коэффициент накладных расходов, равный 0,16.

Расчет затрат на проведение научного исследования приведен в таблице 4.13.

Таблица 4.13 – Бюджет научного исследования

Наименование статьи	Сумма, руб.
1 Материальные затраты	68 023
2 Затраты на оборудование (амортизационные отчисления)	1 701 029
3 Затраты по основной заработной плате исполнителей	1 085 717
4 Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей	130 286
5 Отчисления во внебюджетные фонды	367 233
6 Научные командировки	93 600
7 Оплата работ, выполняемых сторонними организациями	44 960
8 Накладные расходы	558 536
Общий бюджет	4 049 383

Выводы по разделу

В данном разделе было проведено сегментирование рынка. Установлено, что наибольшую часть рынка (85 %) составляют юридические лица – частные и государственные клиники. Также разработанные материалы могут приобретаться вузами и НИИ с целью проведения исследований в области регенеративной медицины. Наконец, потребителями могут быть физические лица, а именно пациенты с травмами ПНС. Затем было проведено сравнение разработанных материалов для восстановления нервной ткани с двумя конкурентными решениями. Для каждого из проектов рассчитана конкурентоспособность. В результате показана высокая конкурентоспособность разработанного изделия.

Проведен SWOT-анализ. Выявлены сильные и слабые стороны разрабатываемого решения, возможности и угрозы для проекта. Определено взаимодействие областей матрицы SWOT между собой.

Определен состав работ научного исследования; рассчитаны трудоемкость и продолжительность проведения каждого вида работ. В данном проекте задействованы 6 человек, включая магистранта, научного руководителя, двух инженеров, научного сотрудника и доцента, а также операторы Томского материаловедческого центра коллективного пользования. Расчетная длительность проекта составляет 256 календарных дней. На основании расчета составлен график проведения научного исследования в виде диаграммы Ганта.

Сформирован бюджет научного исследования. Рассчитаны материальные затраты, затраты на оборудование (в виде амортизационных отчислений), заработную плату, отчисления во внебюджетные фонды, научные командировки, контрагентные работы, накладные расходы. Бюджет проекта составил 4,05 миллиона рублей.

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа		ФИО	
9ДМ11		Шлапакова Лада Евгеньевна	
Школа	ИШХБМТ	Отделение (НОЦ)	-
Уровень образования	магистратура	Направление/специальность	18.04.01 Химическая технология

Тема ВКР:

Получение и исследование пьезополимерных матриц на основе полиоксипропирилата и магнетита биомедицинского назначения
--

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

Введение:

- характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика) и области его применения;
- описание рабочей зоны (рабочего места) при разработке проектного решения.

Объект исследования: магнитоактивные композитные кондуиты.
Область применения: регенеративная медицина нервной ткани.
Рабочая зона: лаборатория.
Размеры помещения: 40 м².
Количество и наименование оборудования рабочей зоны: вытяжной шкаф, электроплитка, установка электроформования полимеров, аналитические весы, ультразвуковая ванна, компьютер.
Рабочие процессы, связанные с объектом исследования, осуществляющиеся в рабочей зоне: синтез магнетита методом химического соосаждения солей железа; изготовление кондуитов методом электроформования полимера с добавлением магнетита; обработка и анализ экспериментальных данных.

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности при разработке проектного решения:

- специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства;
- организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.

ГОСТ 12.2.032-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования.
 ГОСТ 12.2.033-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ стоя. Общие эргономические требования.
 ГОСТ EN 894-1-2012. Безопасность машин. Эргономические требования к оформлению индикаторов и органов управления. Часть 1. Общие руководящие принципы при взаимодействии оператора с индикаторами и органами управления.
 ПНД Ф 12.13.1-03. Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения).
 ГОСТ 12.0.003-2015 Опасные и вредные производственные факторы. Классификация

2. Производственная безопасность при разработке проектного решения:

- анализ выявленных вредных и опасных производственных факторов;
- расчет уровня опасного или вредного производственного фактор.

Опасные производственные факторы:

- движущиеся машины и механизмы, подвижные части оборудования;
- чрезмерно высокая температура материальных объектов;
- электрический ток, вызываемый разницей электрических потенциалов;
- электромагнитные поля постоянного характера, связанного с повышенным образованием электростатических зарядов и наличием электростатического поля, чрезмерно отличающегося от поля Земли.

Вредные производственные факторы:

- загрязнение воздушной среды в зоне дыхания;
- повышенный уровень шума и вибрации;
- электромагнитные поля, неионизирующие ткани тела человека;
- недостаток необходимого естественного и искусственного освещения;
- токсические химические вещества, представляющие опасность при аспирации;
- умственное перенапряжение, в том числе вызванное информационной нагрузкой.
- аномальные параметры микроклимата воздушной: температура и относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха относительно тела работающего, а также тепловое излучение окружающих поверхностей;

Средства коллективной защиты от выявленных факторов:

- от воздействия химических факторов: вентиляция и очистка воздуха;

	<ul style="list-style-type: none"> – средства нормализации освещения: источники света и осветительные приборы; – от поражения электрическим током: оградительные устройства; изолирующие устройства и покрытия, устройства защитного заземления и зануления, устройства автоматического отключения, знаки безопасности. – средства индивидуальной защиты: халаты, перчатки. <p><i>Расчет:</i> система воздухообмена.</p>
3. Экологическая безопасность при разработке проектного решения	<p><i>Воздействие на литосферу:</i> отходы вычислительной и иной техники, бытовой мусор (канцелярские и пищевые отходы, упаковочные материалы, макулатура), отходы люминесцентных ламп и тары растворителей;</p> <p><i>Воздействие на атмосферу:</i> газообразные отходы синтеза материалов;</p> <p><i>Воздействие на гидросферу:</i> городские сточные воды, химические загрязнители (растворители, моющие средства);</p> <p><i>Селитевная зона:</i> незначительные газообразные отходы в городе, бытовой мусор.</p>
4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях при разработке проектного решения	<p><i>Возможные ЧС:</i></p> <p>природные: метеорологические опасные явления (ураган, ливень, метель, заморозки т. д.); гидрологические опасные явления (наводнение, паводок, половодье, подтопление и т. д.);</p> <p>техногенные: пожар в помещении лаборатории, авария электроэнергетических систем, выброс химически опасных веществ при их использовании и транспортировке, внезапное обрушение здания, авария коммунальных систем (канализации, теплосетей, водоснабжения);</p> <p>биолого-социальные: эпидемия.</p> <p><i>Наиболее типичная ЧС:</i> пожар.</p>
Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
	01.03.2023

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
старший преподаватель	Авдеева Ирина Ивановна			

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Шлапакова Лада Евгеньевна		

5 Социальная ответственность

Данная ВКР нацелена на разработку пьезополимерных матриц биомедицинского назначения, а именно магнитоактивных композитных кондуитов на основе полиоксибутирата и магнетита для восстановления нервной ткани при повреждениях периферической нервной системы. Ежегодно регистрируется 300 000 случаев повреждений периферических нервов в Европе и 20 000 000 случаев в США [1, 4]. В России в проведении операций по поводу травм периферических нервов нуждается от 4 до 7 тысяч человек в год [5]. Подобные травмы в 65 % случаев приводят к длительной потере трудоспособности и инвалидности пострадавших. Для реконструкции периферических нервов приобретают популярность полимерные кондуиты, которые представляют собой трубки заданных геометрических размеров и используются для соединения двух концов поврежденного нерва [1-3].

В рамках данной работы композитные полимерные кондуиты изготавливаются методом электроформования (ЭФ), который является универсальной, простой и экономически выгодной технологией получения пористых волокнистых материалов широкого назначения, в том числе для тканевой инженерии. Работы проводятся в лаборатории НИЦ «Физическое материаловедение и композитные материалы» ИШХБМТ ТПУ (к. 3, ауд. 018) общей площадью 40 м². В лаборатории имеется вытяжной шкаф с сантехникой и электроплиткой для проведения химических синтезов и улавливания паров растворителей в ходе ЭФ. Установка ЭФ состоит из непроводящей кубической коробки из толстых листов полиметилметакрилата. Внутри коробки находится вал-коллектор с широким диапазоном скоростей вращения (от 200 до 1200 об./мин). Над валом располагается игла, соединенная через медицинскую магистраль и шприц с автоматической помпой-дозатором полимерного раствора. Скорость подачи раствора задается на этом устройстве работником установки. К игле подведена клемма, которая подает электрический ток от генератора к игле. Электрическое напряжение на генераторе электрического тока варьируется от 5 до 30 кВ в зависимости от свойств полимерного раствора и требуемых свойств получаемого материала. Помимо этого, в лаборатории имеются аналитические весы, ультразвуковая ванна, сушильный шкаф и прочее оборудование, необходимое для получения материалов, а также персональный компьютер.

При выполнении данной ВКР в описанной рабочей зоне выполнялись следующие рабочие процессы: синтез наночастиц магнетита при повышенной температуре; электроформование раствора полиоксибутирата с добавлением наночастиц магнетита;

работа за компьютером по обработке, анализу, обобщению и описанию полученных экспериментальных данных.

5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

Правовую основу обеспечения безопасности и здоровья составляют Конституция РФ; законы и постановления, принятые представительными органами РФ; подзаконные акты. Безопасность работников лабораторий обеспечивают Трудовой кодекс РФ; Федеральный закон «Об основах охраны труда»; Федеральный закон «О специальной оценке условий труда». Из подзаконных актов отметим постановление Правительства РФ «О государственном надзоре и контроле за соблюдением законодательства РФ о труде и охране труда».

Химическая лаборатория характеризуется воздействием вредных химических веществ и высоких температур, загрязнением воздуха рабочей зоны. Для таких условий Трудовым кодексом РФ установлены следующие особенности:

- Работникам бесплатно выдаются специальная одежда, специальная обувь и другие средства индивидуальной защиты, а также смывающие и обезвреживающие средства [ТК РФ, ст. 221].

- Для работников, занятых на работах с вредными и опасными условиями труда, где установлена сокращенная продолжительность рабочего времени, максимально допустимая продолжительность смены не может превышать:

- при 36-часовой рабочей неделе – 8 часов;

- при 30-часовой рабочей неделе и менее – 6 часов;

- Работникам, условия труда которых по результатам специальной оценки отнесены к вредным условиям 2, 3 или 4 степени либо опасным условиям труда, предоставляется ежегодный дополнительный оплачиваемый отпуск. Минимальная продолжительность отпуска составляет 7 календарных дней. Часть отпуска может быть заменена денежной компенсацией [ТК РФ, ст. 117].

- Оплата труда работников, занятых на работах с вредными и опасными условиями труда, устанавливается в повышенном размере. Минимальный размер повышения оплаты составляет 4 % от ставки оклада, установленной для нормальных условий труда [ТК РФ, ст. 147].

- Работники проходят обязательные и периодические медицинские осмотры для определения пригодности для выполнения опасной работы и предупреждения

профессиональных заболеваний. В соответствии с медицинскими рекомендациями указанные работники проходят внеочередные медицинские осмотры [ТК РФ, ст. 212].

– Работодатель обеспечивает бесплатное обучение безопасным методам выполнения работ со стажировкой и сдачей экзаменов; периодическое обучение по охране труда; проверку знаний охраны труда в период работы [ТК РФ, ст. 225].

Работа в вытяжном шкафу и на установке ЭФ осуществляется в положении стоя. Согласно ГОСТ 12.2.033-78 «Рабочее место при выполнении работ стоя», рабочее место должно обеспечивать выполнение трудовых операций в пределах зоны досягаемости моторного поля. Органы управления на рабочей поверхности в горизонтальной и вертикальной плоскостях необходимо размещать с учетом следующих требований:

- очень часто используемые и наиболее важные органы управления должны быть расположены в зоне 1 (Рисунок 5.1);
- часто используемые и менее важные органы управления не допускается располагать за пределами зоны 2;
- редко используемые органы управления не допускается располагать за пределами зоны 3.

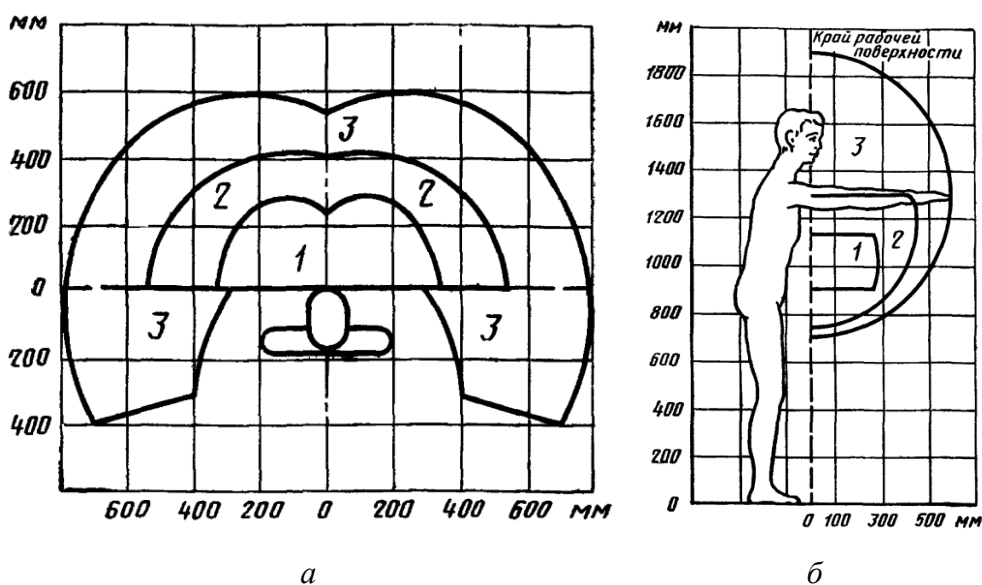


Рисунок 5.1 – Зоны для выполнения ручных операций и размещения органов управления в горизонтальной (а) и вертикальной (б) плоскостях

Средняя высота расположения средств отображения информации должна соответствовать 1365 мм. Часто используемые средства отображения информации необходимо располагать в вертикальной плоскости под углом $\pm 30^\circ$ от нормальной линии

взгляда и в горизонтальной плоскости под углом $\pm 30^\circ$ от сагиттальной плоскости [ГОСТ 12.2.033-78].

Помимо химических синтезов и изготовления материалов, данный проект предусматривает работу за компьютером по обработке и описанию данных, полученных в ходе различных физико-химических анализов. Правила работы за компьютером установлены в СП 2.4.3648-20 «Санитарно-эпидемиологические требования к организации воспитания и обучения, отдыха и оздоровления детей и молодежи»:

- площадь рабочего места должна быть не менее $4,5 \text{ м}^2$;
- минимальная диагональ монитора ПК – не менее 39,6 см. Использование мониторов на основе электронно-лучевых трубок не допускается;
- необходимо предусмотреть естественное и искусственное освещение на рабочем столе. Источник местного освещения на рабочем месте должен располагаться сбоку от экрана ПК. Освещение не должно создавать бликов на поверхности экрана.

В соответствии с ГОСТ 12.2.032-78. «Система стандартов безопасности труда. Рабочее место при выполнении работ сидя», конструкция рабочего места и взаимное расположение всех его элементов (сиденье, органы управления, средства отображения информации и т. д.) должны соответствовать антропометрическим, физиологическим и психологическим требованиям, а также характеру работы. Рабочий стол может быть любой конструкции, отвечающей современным требованиям эргономики и позволяющей удобно разместить на рабочей поверхности оборудование с учетом его количества, размеров и характера выполняемой работы [ГОСТ 12.2.032-78].

5.2 Профессиональная социальная ответственность

5.2.1 Анализ вредных и опасных факторов

В ходе получения наночастиц магнетита и электроформования композита ПОБ/ Fe_3O_4 работник находится под влиянием ряда вредных и опасных факторов, описанных в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Возможные опасные и вредные производственные факторы на рабочем месте при выполнении НИР

№	Факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Нормативные документы
1	Электрический ток, вызываемый разницей электрических потенциалов	ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ. Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов; ГОСТ 12.1.019-2017 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.
2	Электромагнитные поля постоянного характера, связанного с повышенным образованием электростатических зарядов и наличием электростатического поля, чрезмерно отличающегося от поля Земли	ГОСТ 12.1.045-84 ССБТ. Электростатические поля. Допустимые уровни на рабочих местах и требования к проведению контроля; ГОСТ 12.1.006-84 ССБТ. Электромагнитные поля радиочастот. Общие требования безопасности;
3	Загрязнение воздушной среды в зоне дыхания	ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности; СанПиН 1.2.3685-21. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны; ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
4	Движущиеся машины и механизмы, подвижные части оборудования	ГОСТ 12.2.003-91 ССБТ. Оборудование производственное. Общие требования безопасности; ГОСТ 12.3.002-2014 ССБТ. Процессы производственные. Общие требования безопасности.
5	Чрезмерно высокая температура материальных объектов	ГОСТ 12.2.003-91 ССБТ. Оборудование производственное. Общие требования безопасности.
6	Повышенный уровень шума	ГОСТ 12.1.029-80 ССБТ. Средства и методы защиты от шума. Классификация; ГОСТ 12.1.003-2014 ССБТ. Шум. Общие требования безопасности; СП 51.13330.2011. Защита от шума. Актуализированная редакция СНиП 23-03-2003.
7	Повышенный уровень вибрации	ГОСТ 12.1.012-2004 ССБТ. Вибрационная безопасность. Общие требования; СанПиН 1.2.3685-21 Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания.
8	Токсические химические вещества, представляющие опасность при аспирации	ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности; СанПиН 1.2.3685-21. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны; ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
9	Недостаток необходимого естественного и искусственного освещения	СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95*;

		СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещённому освещению жилых и общественных зданий.
10	Аномальные параметры микроклимата: температура и относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха относительно тела работающего, а также тепловое излучение окружающих поверхностей	СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания»
11	Умственное перенапряжение, в том числе вызванное информационной нагрузкой	МР 2.2.9.2311 – 07 «Профилактика стрессового состояния работников при различных видах профессиональной деятельности».

5.2.2 Электрический ток, вызываемый разницей электрических потенциалов

При синтезе наночастиц магнетита и изготовлении электроформованных кондуитов на основе полиоксибутирата и магнетита возникает необходимость работы с электрооборудованием, а именно электрической плиткой, ультразвуковой ванной, установкой электроформования с генератором электрического напряжения, вследствие чего возникает вероятность прохождения электрического тока через тело человека. Опасное и вредное воздействие на людей электрического тока проявляются в виде электротравм (судороги, остановка сердца, остановка дыхания, ожоги и др.) и заболеваний. Результат воздействия тока на человека зависит от величины силы тока, его рода и частоты, продолжительности воздействия и множества других факторов. Причиной поражения электрическим током в условиях лаборатории могут стать случайное прикосновение к токоведущим частям или появление напряжения на металлических частях оборудования. Напряжение прикосновения и токи при нормальном (неаварийном) режиме электроустановки, не должны превышать 8 В и 1 мА, соответственно (постоянный ток) или 2 В, 0,3 мА (переменный ток частотой 50 Гц) согласно ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ «Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов». Для обеспечения защиты от прямого прикосновения необходимо применение таких технических способов и средств основной защиты, как оградительные устройства, изолирующие устройства и покрытия, устройства защитного заземления и зануления, устройства автоматического отключения, знаки безопасности, средства индивидуальной защиты по ГОСТ 12.1.019-2017 ССБТ «Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты». Перед установкой электроформования допускается стоять только на резиновом коврике, работать с установкой в непроводящих одежде и перчатках.

Согласно ст. 212 ТК РФ, работодатель обязан проводить инструктажи по электробезопасности. Существует несколько видов инструктажей по электробезопасности:

вводный, первичный, повторный, внеплановый и целевой. Инструктажи проводятся для персонала 3 групп:

- неэлектротехнический (1 группа допуска). Инструктаж по электробезопасности для персонала с 1 группой допуска носит вводный характер;
- электротехнологический (2 группа). Для данной категории работников предусмотрены все виды инструктажей, а также ежегодная экзаменация по ПТЭЭП.
- электротехнический. (3, 4, 5 группа электробезопасности). Персонал проходит все типы инструктажей и ежегодную проверку знаний.

Первичный инструктаж проводится при вступлении в должность. Повторный инструктаж по электробезопасности для 1 группы проводится один раз в год, для прочих групп – один раз в 6 месяцев.

5.2.3 Электромагнитные и электростатические поля

Главным источником электростатических зарядов на рассматриваемом рабочем месте является установка электроформования. Воздействие статического электричества на организм человека проявляется в виде слабого длительно протекающего тока либо в форме кратковременного разряда через тело человека, в результате чего может произойти несчастный случай. Кроме того, происходят изменения со стороны центральной нервной и сердечно-сосудистой систем организма. Допустимые уровни напряженности электростатических полей установлены ГОСТ 12.1.045–84 «ССБТ. Электростатические поля. Допустимые уровни на рабочих местах и требования к проведению контроля». Предельно допустимый уровень напряженности электростатического поля $E_{\text{пред}}$ устанавливается равным 60 кВ/м в течение одного часа.

Защита от статического электричества осуществляется за счет:

- уменьшения генерации электрических зарядов (корректный подбор пар соприкасающихся материалов, снижение силы и скорости трения);
- устранения уже образовавшихся зарядов (заземление электропроводных частей, применение нейтрализаторов статического электричества и увлажнение воздуха).

В качестве средств индивидуальной защиты применяют обувь на кожаной подошве и антистатические халаты.

При работе с персональным компьютером (ПК) работник также подвергается воздействию ряда электромагнитного и электростатического полей. В соответствии с СанПиН 1.2.3685-21, предельно допустимые уровни (ПДУ) напряженности электростатического поля

составляют 20 кВ/м при воздействии 8 ч за смену и 60 кВ/м при воздействии 1 ч за смену; ПДУ электромагнитного поля частотой 50 Гц на рабочем месте составляет 5 кВ/м.

Для обеспечения нормальной электромагнитной обстановки при работе с ПК необходимо соблюдать следующие требования:

- заземление системного блока и источника питания ПК;
- площадь, приходящаяся на одно рабочее место, должна составлять не менее 6 м²
- для предотвращения накопления статических зарядов увлажнять воздух в помещении, например, с помощью увлажнителей.

5.2.4 Движущиеся машины и механизмы, подвижные части оборудования

Источником опасности является вал-коллектор в установке электроформования, вращающийся со скоростями от 200 до 3200 об./мин. Согласно ГОСТ 12.2.003-91, конструкция оборудования должна исключать на всех предусмотренных режимах работы нагрузки на детали и сборочные единицы, способные вызвать разрушения, представляющие опасность для работающих. Конструкция оборудования и его частей должна исключать возможность их падения, опрокидывания и самопроизвольного смещения. Конструкция оборудования должна исключать самопроизвольное ослабление или разъединение креплений сборочных единиц и деталей, а также исключать перемещение подвижных частей за пределы установки. Движущиеся части оборудования должны быть ограждены или расположены так, чтобы исключалась возможность прикасания к ним работающего. Форма, размеры, прочность и жесткость защитного ограждения, его расположение относительно ограждаемых частей должны исключать воздействие на работающего ограждаемых частей. Конструкция защитного ограждения должна:

- 1) исключать возможность самопроизвольного перемещения из положения, обеспечивающего защиту работающего;
- 2) допускать возможность его перемещения из положения, обеспечивающего защиту работающего только с помощью инструмента;
- 3) обеспечивать возможность выполнения работающим предусмотренных действий, включая наблюдение за работой ограждаемых частей производственного оборудования;
- 4) не создавать дополнительные опасные ситуации;
- 5) не снижать производительность труда.

5.2.5 Загрязнение воздушной среды в зоне дыхания

Для получения электроформованных кондуитов полиоксибутират растворяют в смеси хлороформа с ацетоном. Данные органические растворители испаряются в ходе электроформования. Опасность может возникнуть при несоблюдении техники безопасности или неисправности оборудования при работе с вытяжным шкафом.

Вдыхание хлороформа пагубно влияет на работу центральной нервной системы. Вдыхание воздуха с содержанием хлороформа порядка 0,09 % (900 ppm) за короткое время может вызвать головокружение, усталость и головную боль. Постоянное воздействие хлороформа может вызвать заболевания печени и почек. Хлороформ может вызывать аллергическую реакцию, приводящую к повышению температуры тела (до 40 °С). Часто вызывает рвоту. При длительном воздействии на дыхательные пути и слизистые оболочки человека (2—10 минут) возможен летальный исход. Предположительно мутагенен и канцерогенен. Данные свойства проявляются только при превышении концентрации хлороформа в воздухе. По данным ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны» среднесменная ПДК 5 мг/м³, максимально-разовая — 10 мг/м³. В то же время порог восприятия запаха хлороформа значительно выше и может составлять до 1350 мг/м³ [doi: 10.1111%2Fj.1749-6632.1974.tb49851.x].

Ацетон токсичен. По данным ГН 2.2.5.3532-18, ПДК ацетона составляет 200 мг/м³ (среднесменная за 8 часов) и 800 мг/м³ (максимально-разовая). По данным ряда исследований, например [doi: 10.1080%2F15428119791012342], средний порог восприятия запаха в ~3 раза выше, чем максимально-разовая ПДК, и в ~12 раз выше среднесменной ПДК. Ацетон ядовит, но относится к малоопасным веществам (класс опасности IV). Сильно раздражает слизистые оболочки: длительное вдыхание больших концентраций паров приводит к возникновению воспаления слизистых оболочек, отёку лёгких и токсической пневмонии. Пары оказывают слабое наркотическое действие, сопровождаемое, чаще всего, дисфорией. При ингаляционном воздействии ацетон выводится гораздо медленнее (в течение нескольких часов), чем поступает, и поэтому может накапливаться в организме.

При работе с указанными веществами необходимо строгое соблюдение техники безопасности, а именно использование исправного вытяжного шкафа, ношение халата и перчаток. Данные вещества следует хранить и использовать в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности». Бутылки при работе следует закрывать (т.е. не оставлять открытыми). Категорически

запрещается ставить бутылки с горючими веществами рядом с открытым огнем и нагревающимися элементами.

Произведем расчёт воздухообмена для очистки воздуха в рассматриваемой лаборатории при испарении растворителей. Потребный воздухообмен определяется по формуле (5.1):

$$L = \frac{1000G}{x_B - x_H} \quad (5.1)$$

где L – потребный воздухообмен, м³/ч; G – количество вредных веществ, выделяющихся в воздух помещения, г/ч; x_B – предельно допустимая концентрация вредности в воздухе рабочей зоны помещения по ГОСТ 12.1.005-88; x_H – максимально возможная концентрация той же вредности в воздухе населенных мест по СанПиН 1.2.3685-21.

Применяется также понятие кратности воздухообмена n , ч⁻¹, которая показывает, сколько раз в течение одного часа воздух полностью сменяется в помещении. Кратность воздухообмена определяется по формуле:

$$n = \frac{L}{V} \quad (5.2)$$

где V – внутренний объем помещения, м³. Согласно СП 2.2.3670-20, кратность воздухообмена $n > 10$ недопустима.

При получении исследуемых кондуитов скорость подачи раствора для электроформования устанавливается на автоматической помпе-дозаторе равной 0,5 мл/ч. С учетом плотности хлороформа $G = 0,745 \frac{г}{ч}$. Предельно допустимая концентрация вредности в воздухе рабочей зоны помещения (x_B) хлороформа, согласно ГОСТ 12.1.005-88, составляет 5 мг/м³; максимально возможная концентрация той же вредности в воздухе населенных мест (x_H) по СанПиН 1.2.3685-21 равна 0,1 мг/м³. Таким образом,

$$L = \frac{1000 * 0,745}{0,5 - 0,1} = 1862,5 \frac{м^3}{ч}; n = \frac{1862,5}{240} = 7,76 \text{ ч}^{-1}.$$

5.2.6 Чрезмерно высокая температура материальных объектов

При получении указанных материалов используются электроприборы с нагревательными элементами, например, электроплитка и сушильный шкаф. В результате несоблюдения техники безопасности и неосторожности при работе с данным оборудованием можно получить ожоги различной степени тяжести. Помимо этого, синтез магнетита проходит при повышенных температурах, и разлив горячей суспензии на кожу также может повлечь ожоги.

Конструкция оборудования и его размещение должны исключать контакт нагреваемых элементов с пожаровзрывоопасными веществами, а также исключать возможность касания работника с нагревающимися элементами или нахождение его вблизи таких элементов, если это может повлечь за собой травмирование, перегрев работника. Если назначение оборудования и условия его эксплуатации (например, использование вне лаборатории) не могут полностью исключить контакт работающего с нагревающимися элементами, то эксплуатационная документация должна содержать требование об использовании средств индивидуальной защиты по ГОСТ 12.2.003-91 ССБТ «Оборудование производственное. Общие требования безопасности». Конструкция оборудования должна исключать опасность, вызываемую разбрызгиванием горячих материалов и веществ. Если конструкция не может полностью обеспечить исключение такой опасности, то эксплуатационная документация должна содержать требования об использовании средств защиты, не входящих в конструкцию. Нагревающиеся части оборудования должны быть защищены ограждениями или расположены так, чтобы предотвратить их случайное прикосновение работником. Также эти части должны быть отмечены соответствующими предупреждающими вывесками об опасности ожогов.

5.2.7 Повышенный уровень шума и вибрации

При работе в лаборатории в ходе данной НИР на исследователя оказывают влияние факторы, связанные с акустическими колебаниями, а именно повышенный уровень и другие неблагоприятные характеристики шума. Источниками шума являются вентиляционные системы помещения (вытяжной шкаф), подвижные элементы установки электроформования (например, вал-коллектор) и ультразвуковая ванна.

Шум на рабочем месте оказывает раздражающее влияние на работника, повышает его утомляемость, а при выполнении задач, требующих внимания и сосредоточенности, способен привести к росту ошибок и увеличению продолжительности выполнения задания. Длительное воздействие шума влечет тугоухость работника вплоть до его полной глухоты, увеличению риска артериальной гипертензии, болезней сердечно-сосудистой, нервной системы и др.

Согласно СанПиН 2.1.3685-21 (Таблица 5.66), уровень звука при сосредоточенной работе (наблюдение и дистанционное управление процессами в помещениях лабораторий с шумным оборудованием) должен составлять 80 дБ. Необходимо применение архитектурно-планировочных методов, которые включают в себя рациональное размещение оборудования, машин, механизмов, рабочих мест, создание шумозащитных

зон [СанПиН 2.1.3685-21]. Конструкция лабораторных установок, создающих шум, должна быть разработана, чтобы минимизировать уровень шума. Помимо этого, необходимо использовать средства индивидуальной защиты, такие как защитные наушники или беруши по ГОСТ 12.4.011-89 ССБТ «Средства защиты работающих. Общие требования и классификация».

Помимо шума, на оператора установки электроформования может оказывать влияние вибрация. При воздействии вибрации наблюдаются нарушения сердечной деятельности, расстройство нервной системы, спазмы сосудов, изменения в суставах, приводящие к ограничению подвижности, изменения в вестибулярном аппарате. Длительное воздействие вибрации приводит к профессиональному заболеванию – вибрационной болезни.

Чтобы снизить вибрацию в источнике ее возникновения необходим тщательный подбор режима работы оборудования и балансировка вращающихся механизмов. Для снижения вибрации по пути ее распространения используется виброгашение, виброизоляция (пружины, резиновые или пробковые прокладки), средства индивидуальной защиты (виброзащитные перчатки и обувь).

5.2.8 Токсические химические вещества

Синтез наночастиц магнетита проводится с участием 25 % раствора аммиака. Аммиачная вода – токсичное вещество (смертельная доза для человека 10–15 г). В соответствии с ГОСТ 12.1.007-76, аммиачная вода относится к токсичным малоопасным веществам по степени воздействия на организм 4-го класса опасности. Обладает резко выраженными прижигающим и раздражающим действиями; вредно воздействует на центральную нервную систему. Рекомендуемая ПДК в воздухе рабочей зоны 20 мг/м³ [ГОСТ 12.1.007-76].

Для получения электроформованных кондуитов полиоксибутират растворяют в смеси хлороформа с ацетоном. Данные органические растворители испаряются в ходе электроформования. Вдыхание воздуха с содержанием хлороформа порядка 0,09 % (900 ppm) за короткое время может вызвать головокружение, усталость и головную боль. Постоянное воздействие хлороформа может вызвать заболевания печени и почек. Хлороформ может вызывать аллергическую реакцию, приводящую к повышению температуры тела (до 40 °С). Часто вызывает рвоту. При длительном воздействии на дыхательные пути и слизистые оболочки человека (2–10 минут) возможен летальный исход. Предположительно мутагенен и канцерогенен.

Ацетон токсичен. Сильно раздражает слизистые оболочки: длительное вдыхание больших концентраций паров приводит к возникновению воспаления слизистых оболочек, отёку лёгких и токсической пневмонии. Пары оказывают слабое наркотическое действие, сопровождаемое, чаще всего, дисфорией. При ингаляционном воздействии ацетон выводится гораздо медленнее (в течение нескольких часов), чем поступает, и поэтому может накапливаться в организме.

При работе с указанными веществами необходимо строгое соблюдение техники безопасности, а именно использование исправного вытяжного шкафа, ношение халата и перчаток. Данные вещества следует хранить и использовать в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности». Бутылки при работе следует закрывать (т.е. не оставлять открытыми). Категорически запрещается ставить бутылки с горючими веществами рядом с открытым огнем и нагревающимися элементами.

5.2.9 Недостаток необходимого естественного и искусственного освещения

При длительной работе в условиях недостаточной освещенности или нарушении параметров световой среды, происходит негативное воздействие на организм человека, такое как развитие близорукости, головная боль, ухудшение зрения и пр.

Согласно СП 52.13330.2016 «Естественное и искусственное освещение», естественное освещение характеризуется коэффициентом естественной освещенности (КЕО). КЕО зависит от разряда точности работ и конструктивного исполнения освещения. Искусственное освещение нормируется с помощью освещенности рабочей поверхности E . Работа в лаборатории предполагает работу со сложным оборудованием, а также за компьютером. Работнику необходимо различать органы управления установок (кнопочные и поворотные выключатели и переключатели, тумблеры), визуальные индикаторы, шкалы с числами и единицами измерения. Поэтому зрительная работа лаборанта относится ко II разряду (работа очень высокой точности). Контраст объектов с фоном – средний. Фон – светлый. Тип освещения – общий. Согласно СП 52.13330.2016, освещенность рабочего места лаборанта примем 300 лк.

При работе за компьютером освещенность на поверхности стола должна быть 300-500 лк. Освещение не должно создавать бликов на поверхности экрана. Освещенность поверхности экрана не должна превышать 300 лк согласно СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещённому освещению жилых и общественных зданий».

5.2.10 Аномальные параметры микроклимата

Неблагоприятные параметры микроклимата ухудшают самочувствие работника, снижает производительность труда и приводит к заболеваниям. Для создания нормальных условий труда СанПиН 2.1.3685-21 устанавливает нормативные значения параметров микроклимата (Таблица 5.4). По степени тяжести работа над данным научно-исследовательским проектом относится к категории Ib: работы, производимые сидя, стоя или связанные с ходьбой и некоторым физическим напряжением с интенсивностью энергозатрат 121-150 ккал/ч.

Таблица 5.4 – Оптимальные параметры микроклимата на рабочем месте

Период	Категория работ	Температура воздуха, °С	Отн. влажность воздуха, %	Скорость движения воздуха, м/с, не более
Холодный	Легкая Ib	21÷23	15÷75	0,1÷0,2
Теплый		22÷24		

Для поддержания нормальных параметров микроклимата на рассматриваемом рабочем месте необходимы:

- система вентиляции;
- кондиционирование и отопление воздуха;
- увлажнители воздуха (при сухости).

5.2.11 Умственное перенапряжение, в том числе вызванное информационной нагрузкой

Научная работа, включая экспериментальную работу по получению исследуемых материалов и умственную работу по обработке экспериментальных данных, предполагает значительные зрительные и умственные нагрузки на организм человека. При этом требуется длительное сосредоточенное внимание, ответственность, плотность сигналов и сообщений в единицу времени по МР 2.2.9.2311–07 «Профилактика стрессового состояния работников при различных видах профессиональной деятельности». Длительная умственная нагрузка при несоблюдении чередования работы и отдыха оказывает угнетающее влияние на психическое состояние человека, ухудшает функции внимания (объем, концентрацию, переключение), памяти (кратковременной и долговременной), восприятия (появляется большое число ошибок). При зрительной нагрузке необходима высокая координация сенсорных и моторных элементов зрительной системы. Зрительное перенапряжение вызывает головную боль, ухудшение зрения, астенопию.

Для снижения умственного перенапряжения и монотонности труда следует рационально чередовать периоды работы и отдыха, менять положение тела и, по возможности, характер работы. Хорошему психоэмоциональному состоянию способствует эстетический интерьер, удобная мебель, специальная музыка, прием тонизирующих напитков и т. п. Также для устранения накопленной усталости и нагрузки стоит выполнять комплекс физических упражнений на координацию движений, концентрацию внимания, гимнастику глаз, использовать методику психической саморегуляции.

5.3 Экологическая безопасность

Атмосфера. В ходе химического синтеза и электроформования полимерных кондуитов происходит испарение органических растворителей, а именно хлороформа и ацетона, которые улавливаются в вытяжном шкафу и далее выводятся на улицу в атмосферу. Это является источником загрязнения атмосферы. Разовые и среднесуточные концентрации указанных веществ не должны превышать значения, установленные СанПиН 1.2.3685-21. Среднесуточная (ПДК с. с.) и максимально разовая (ПДК м. р.) ПДК хлороформа в атмосферном воздухе составляют $0,03 \text{ мг/м}^3$ и $0,1 \text{ мг/м}^3$, соответственно. ПДК с. с. и ПДК м. р. ацетона составляют $0,35 \text{ мг/м}^3$.

Для сокращения влияния газообразных отходов на атмосферу они подвергаются очистке с помощью аппаратов для улавливания паров и газов (абсорберов, хемосорберов, адсорберов, нейтрализаторов). Однако в лабораторной практике, в отличие от производственной среды, выбросы вредных газообразных веществ из вытяжных шкафов в атмосферу незначительны, поэтому затраты на очистительные системы нецелесообразны и, как правило, не применяются. Помимо этого, 3-й корпус ТПУ находится в достаточно озелененной зоне города, что нивелирует последствия выбросов из лабораторий.

Гидросфера. Источником загрязнения гидросферы могут стать жидкие отходы, содержащие растворители, соли железа, кислоты и щелочи при их некорректной утилизации. Указанные загрязнители приводят к изменению химического состава воды. Согласно СанПиН 1.2.3685-21, ПДК хлороформа в воде составляет $0,06 \text{ мг/л}$ (1 класс опасности). Согласно Приказу Федерального агентства по рыболовству от 18 января 2010 г. № 20 ПДК хлороформа в водах водных объектов рыбохозяйственного значения составляет $0,005 \text{ мг/дм}^3$ (1 класс); ацетона – $0,05 \text{ мг/дм}^3$ (3 класс). Помимо этого, источником загрязнения являются городские сточные воды от санитарных узлов корпусов университета. Сточные воды корпусов спускаются в канализацию и смешиваются с городскими сточными водами. Затем эти воды очищаются перед сбросом в водоемы. Очистные сооружения находятся в ведении городских коммунальных служб.

Для защиты гидросферы от вредных сбросов можно предпринять следующие мероприятия:

- Исключить сброс растворителей в гидросферу путем сбора их в специально отведенную тару с последующей очисткой (например, методом прямой перегонки) и повторным использованием. Это не только снизит негативное влияние на гидросферу, но и повысит экономичность научного исследования.
- Для выделения кислот, щелочей и солей железа применяется нейтрализация – объединение катионов водорода с гидроксильными группами с образованием молекул воды до образования нейтральной $pH \approx 7$. Наиболее дешевым и доступным реагентом для нейтрализации кислот (в данной работе используется лимонная кислота) применяется гашеная известь. Для нейтрализации воды с содержанием щелочи (после синтеза магнетита) можно использовать серную или соляную кислоты.
- Использовать биоразлагаемые моющие средства.

Литосфера. Источниками негативного влияния на литосферу являются отходы вычислительной и иной техники, бытовой мусор (канцелярские и пищевые отходы, упаковочные материалы, макулатура), отходы люминесцентных ламп и тары растворителей. Многие виды мусора в естественных условиях могут разлагаться, возгораться и образовывать химические вещества, загрязняющие воздух и воду. К ним относятся отработанные люминесцентные лампы и емкости из-под растворителей.

При сборе отходы должны сортироваться в зависимости от дальнейшего использования, способа переработки, утилизации, захоронения. Полезные отходы подвергаются переработке, что способствует защите окружающей среды от загрязнения и сохранению природных ресурсов. Переработка отходов электронной промышленности (вычислительная техника и иные приборы) осуществляется путем разделения на отдельные однородные компоненты, выделения химическими методами ценных компонентов, направления их для повторного использования. Пластиковые отходы рационально перерабатывать методом пиролиза с получением других ценных продуктов. Также отходы часто перерабатываются сжиганием. При этом мусоросжигающие заводы должны оборудоваться высокоэффективными системами пыле- и газоочистки.

Отходы, не подлежащие переработке и дальнейшему использованию в качестве вторичных ресурсов, подвергаются захоронению на полигонах. Полигоны создают в соответствии с требованиями СНиП 2.01.28–85 «Полигоны по обезвреживанию и захоронению токсичных промышленных отходов. Основные положения по проектированию». Использованные органические растворители, обрезки пластмасс и

оргстекла, люминесцентные лампы, испорченные баллоны с остатками веществ и т.п. подлежат приему на полигоны. Полигоны должны располагаться вдали от водоохраных зон и иметь санитарно-защитные зоны. В местах складирования выполняется гидроизоляция для исключения загрязнения грунтовых вод.

Для радикального снижения отходов необходимо максимизировать повторное использование всех материалов, например прошедших очистку химических реагентов и растворителей, бумаги и т.д.

Селитебная зона. Как отмечалось ранее, рассматриваемая научная работа предполагает образование вредных газообразных отходов, выбрасываемых в атмосферу в городе. Согласно Федеральному закону № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» предприятия, оказывающие воздействия на среду обитания и здоровье человека, должны иметь санитарно-защитную зону (СЗЗ). Источниками воздействия на среду обитания и здоровье человека являются объекты, для которых уровни создаваемого загрязнения превышают ПДК и/или ПДУ и/или вклад в загрязнение жилых зон превышает 0,1 ПДК. Это не относится к университету, оснащённому химическими лабораториями, поэтому университеты не имеют СЗЗ.

Для предотвращения механического загрязнения и поддержания чистоты города необходимо сортировать бытовые отходы в зависимости от материала, способа переработки, утилизации, захоронения и выбрасывать их в соответствующие контейнеры. Мусор из контейнеров должен своевременно вывозиться городскими службами.

5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

5.4.1 Анализ вероятных чрезвычайных ситуаций, которые может инициировать объект исследования

При работе в рассматриваемой лаборатории могут возникнуть следующие чрезвычайные ситуации (ЧС) природного, техногенного и биолого-социального характера.

Природные. В Томске могут наблюдаться метеорологические и гидрологические аномальные явления, такие как ураган, ливень (в теплое время года), метель, заморозки (зимой), наводнение, паводок, половодье, подтопление (весной). В результате этого могут нарушаться нормальные условия жизни и труда людей, возникает угроза их жизни и здоровью, наносится ущерб имуществу университета (зданиям и находящемуся в них оборудованию) и окружающей среде.

Техногенные. Существует вероятность пожара в помещении лаборатории, аварий электроэнергетических систем, выброса химически опасных веществ при их использовании

и транспортировке, внезапного обрушения здания, аварий коммунальных систем (канализации, теплосетей, водоснабжения). Причинами перечисленных ЧС могут быть неосторожность, невнимательность, халатность персонала; несвоевременное и/или некачественное обслуживание (осмотр, ремонт) электроэнергетических и коммунальных систем; обветшалость зданий. Также техногенные аварии могут быть следствием природных катаклизмов.

Биолого-социальные. Эпидемия – это массовое распространение инфекционных заболеваний людей. Эпидемии вирусных заболеваний могут нанести вред здоровью, жизни и трудоспособности персонала, а также замедлить ход научного исследования вследствие карантина или изоляции, приостановки поставок материалов и оборудования и т.д.

5.4.2 Обоснование мероприятий по предотвращению ЧС и разработка порядка действия в случае возникновения ЧС

Наиболее типичной ЧС в рассматриваемой лаборатории является пожар. Источником возникновения ЧС – легковоспламеняющиеся жидкости, находящиеся в лаборатории (хлороформ, ацетон, этиловый спирт и др.), которые образуют с воздухом взрывоопасные смеси. При нарушении условий хранения этих жидкостей (например, при нахождении их вблизи источников тепла) возможно самовоспламенение. Помимо этого, пожар может возникнуть вследствие короткого замыкания при работе с электрическими приборами (электроплитка, ультразвуковая ванна, сушильный шкаф, компьютер и др.). Также пожар могут вызывать искры при неполадках в работе генератора электрического тока. Для предотвращения пожара необходимо соблюдать требования, указанные в ГОСТ 12.1.004-91 «Пожарная безопасность. Общие требования»:

- изоляция горючей среды (применением изолированных отсеков, камер, кабин и т.п.);
- поддержание безопасной концентрации среды;
- поддержание температуры и давления среды, при которых распространение пламени исключается;
- применение оборудования, при эксплуатации которого не образуются источники зажигания;
- применение электрооборудования, соответствующего пожароопасной и взрывоопасной зонам;

– поддержание температуры нагрева оборудования, веществ и материалов, которые могут войти в контакт с горючей средой, ниже предельно допустимой, составляющей 80 % наименьшей температуры самовоспламенения горючего;

– применением неискрящего инструмента при работе с легковоспламеняющимися жидкостями;

– ликвидация условий для теплового и химического самовозгорания обращающихся веществ, материалов, изделий и конструкций;

– удаление пожароопасных отходов производства.

– проведение противопожарных инструктажей в соответствии с Приказом МЧС РФ от 18 ноября 2021 года N 806: вводный, первичный, повторный, внеплановый и целевой. Для регистрации всех противопожарных инструктажей необходим Журнал учета противопожарных инструктажей.

При появлении пожара, сотрудник, увидевший пожар, должен незамедлительно сообщить об этом в пожарную службу по телефонному номеру 01 или 112, заявить о происшествии и соблюдать покой. В случае возникновения пожара в здании автоматически срабатывают датчики пожаротушения, и звуковая система оповещает всех сотрудников о немедленной эвакуации из здания. Сотрудники направляются на выход в соответствии с планом эвакуации при пожарах и других ЧС. На этаже находится углекислотный и порошковый огнетушители и эвакуационные выходы.

Выводы по разделу

В разделе «Социальная ответственность» рассмотрены правовые нормы трудового законодательства для работ с вредными и опасными условиями труда; разработаны решения по оптимальной компоновке рабочей зоны лаборанта.

Выявлены возможные вредные и опасные факторы на рассматриваемом рабочем месте. Подвижные части установки электроформования, а также нагревающиеся элементы (нагревательная панель электроплитки), представляющие опасность, надежно ограждены в соответствии ГОСТ 12.2.003-91 ССБТ «Оборудование производственное. Общие требования безопасности». Напряжение прикосновения при работе установки (5–20 кВ) значительно превышает безопасные значения, установленные в ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ «Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов» (8 В). Поэтому при работе с установкой предусмотрена основная изоляция, защитное отключение, безопасное расположение токоведущих частей, средства индивидуальной защиты по ГОСТ 12.1.019-2017 ССБТ «Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты». ПДК вредных веществ, таких как хлороформ и ацетон, в воздухе рабочей зоны составляют 5 мг/м³ [ГОСТ 20015-88 «Хлороформ. Технические условия»] и 200 мг/м³ [ГОСТ 2768-84 «Ацетон технический. Технические условия»]. При работе в лаборатории вредные вещества улавливаются в вытяжном шкафу. Расчётный потребный воздухообмен и кратность воздухообмена составляют 1862,5 м³/ч и 7,8 ч⁻¹, соответственно. Согласно СанПиН 2.1.3685-21, уровень звука при сосредоточенной работе (наблюдение и дистанционное управление процессами в помещениях лабораторий с шумным оборудованием) должен составлять 80 дБ. Уровень шума на исследуемом рабочем месте не измерялся. Согласно СанПиН 2.1.3685-21, оптимальные значения температуры воздуха в холодный период составляют 21–23 °С; в тёплый 22–24 °С (категория работ Ib). Оптимальная относительная влажность воздуха, вне зависимости от времени года, составляет 15–75 %. Фактические параметры микроклимата в лаборатории соответствуют установленным нормативом.

Согласно ПУЭ, по электробезопасности рассматриваемое помещение относится к помещениям с повышенной опасностью. Согласно Правилам по охране труда при эксплуатации электроустановок, в данной лаборатории может работать персонал от I до IV квалификационной группы (в зависимости от используемого оборудования и выполняемых работ). До работы с установкой электроформования допускаются сотрудники IV группы электробезопасности.

Согласно СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания», по степени тяжести работа над данным научно-исследовательским проектом относится к категории Ib: работы, производимые сидя, стоя или связанные с ходьбой и некоторым физическим напряжением с интенсивностью энергозатрат 121-150 ккал/ч.

Выявлены возможные чрезвычайные ситуации природного, техногенного и биолого-социального характера. Наиболее типичная ЧС в лаборатории – пожар. По взрывопожарной и пожарной опасности рабочее место относится к категории ВЗ «Пожароопасность» [СП 12.13130.2009 «Определение категорий помещений, зданий и наружных установок по взрывопожарной и пожарной опасности»]. Разработаны меры по предупреждению пожара и действия персонала в случае пожара.

По степени воздействия на окружающую среду ТПУ относится к III категории «Объекты, оказывающие незначительное негативное воздействие на окружающую среду». Произведен анализ воздействия на атмосферу, гидросферу, литосферу и селитебную зону. Приведена характеристика сточных вод и газообразных выбросов. Описаны способы обезвреживания и утилизации отходов.

Заключение

В данном исследовании были впервые разработаны электроформованные магнитоактивные кондуиты для инженерии нервной ткани на основе биосовместимого биоразлагаемого ПОБ и МНЧ Fe_3O_4 , модифицированных ЛК. МНЧ Fe_3O_4 -ЛК со средним диаметром 30 нм синтезированы методом химического соосаждения и исследованы методами СЭМ, РФА, РФЭС и КР-спектроскопии. РФЭС-анализ подтвердил наличие ЛК на поверхности МНЧ, что указывает на успешную модификацию. σ_s полученных МНЧ составляет $61,88 \pm 0,29$ эме/г. Fe_3O_4 -ЛК (8 мас. %) был введен в матрицу ПОБ для получения трубчатых магнитоактивных кондуитов. Основные выводы данного исследования следующие:

1) СЭМ кондуитов позволил выявить бездефектные случайно ориентированные волокна диаметром $0,9 \pm 0,2$ и $1,2 \pm 0,1$ мкм для чистого ПОБ и композита ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК, соответственно. Оба кондуита имеют пористую структуру, обеспечивающую перенос питательных веществ, метаболитов и газов. Кроме того, большая площадь поверхности увеличивает адгезию клеток. Введение Fe_3O_4 -ЛК не влияет на пористость ($83,5 \pm 2,1$ и $82,3 \pm 1,1$ % для чистого и композитного кондуитов, соответственно), однако нанотопография композитного кондуита ПОБ/ Fe_3O_4 -ЛК значительно улучшается, что доказано методами СЭМ и АСМ. Профили топографии волокон показали увеличение R_a для композита от $11,2 \pm 1,9$ до $19,4 \pm 5,5$ нм по сравнению с чистым ПОБ.

2) Методом РФА показано, что МНЧ Fe_3O_4 -ЛК ограничивают кристаллизацию ПОБ вдоль кристаллографической оси b , делая его кристаллическую структуру более изотропной. Кроме того, увеличение интенсивности брэгговского рефлекса при 20° плоскости (110) β -фазы ПОБ указывает на то, что добавление Fe_3O_4 -ЛК может индуцировать образование электроактивной β -фазы в ПОБ.

3) Спектры КР композитного кондуита содержат пики ПОБ и чистого по фазовому составу магнетита. Таким образом, в процессе ЭФ не происходит окисления и фазовых превращений Fe_3O_4 -ЛК, благодаря поверхностной модификации лимонной кислотой.

4) По данным |ДСК, X_c кондуитов снижается при добавлении МНЧ Fe_3O_4 -ЛК от 58,5 до 54,0 % за счет наличия агломератов Fe_3O_4 -ЛК, которые ограничивают подвижность полимерных цепей и препятствуют их кристаллизации.

5) РФЭС-анализ не выявил МНЧ Fe_3O_4 -ЛК в исследуемом поверхностном слое композитного кондуита. Таким образом, МНЧ расположены внутри волокон на глубине, превышающей предел обнаружения методом РФЭС.

6) Значение σ_s магнитоактивного кондуита ПОб/Fe₃O₄-ЛК составляет $7,44 \pm 0,07$ эме/г. Установлено, что введение Fe₃O₄-ЛК в матрицу ПОб приводит к резкому увеличению H_c магнетита от $8,6 \pm 0,3$ до 42 ± 2 Э. Это связано с наличием немагнитной примеси (т.е. волокон ПОб) и внутренними напряжениями в материале. Конduit ПОб/Fe₃O₄-ЛК труднее размагничивается по сравнению с частицами Fe₃O₄-ЛК из-за сопротивления волокна ПОб, препятствующего выравниванию магнитных моментов магнетита.

7) Добавление Fe₃O₄-ЛК в кондуиты повышает гидрофильность кондуитов на основе ПОб, о чем свидетельствует снижение значений угла смачивания θ_s от $129,7 \pm 0,8^\circ$ до $125,7 \pm 1,1^\circ$. Значения нарастающего (θ_a) и убывающего (θ_r) углов смачивания демонстрируют аналогичную тенденцию. Кроме того, свободная поверхностная энергия σ значительно увеличивается от $53,0 \pm 1,5$ до $72,2 \pm 2,5$ мН/м для чистого и композитного кондуитов, соответственно, в то время как гистерезис угла смачивания θ_h увеличивается от $22,9 \pm 1,7^\circ$ до $26,9 \pm 2,6^\circ$ после добавления Fe₃O₄-ЛК.

8) С применением двух клеточных линий доказана биосовместимость кондуитов ПОб и ПОб/Fe₃O₄-ЛК, как под воздействием МП, так и без него. Как МСК, так и клетки нейробластомы SH-SY5Y прикрепляются и пролиферируют на исследуемых материалах.

9) Скорость пролиферации МСК на поверхности кондуита из чистого ПОб сравнима с таковой на культуральном пластике. Магнитные кондуиты ПОб/Fe₃O₄-ЛК в большей степени поддерживают адгезию и пролиферацию МСК, что может быть связано с повышенной шероховатостью поверхности композита.

10) Скорость пролиферации SH-SY5Y снижается в случае композитного кондуита ПОб/Fe₃O₄-ЛК в сравнении с чистым ПОб. Применение низкочастотного МП также снижает пролиферацию нейробластомы на поверхности кондуита из чистого ПОб и на культуральном пластике. В отличие от этого, пролиферация клеток на кондуите ПОб/Fe₃O₄-ЛК не подавляется при внесении их в МП. Это можно объяснить магнитомеханическим эффектом ПОб/Fe₃O₄-ЛК во внешнем МП.

11) ин vivo

Разработанные кондуиты являются перспективными кандидатами для дальнейших доклинических испытаний и клинического применения в восстановлении травм периферической нервной системы. Применение полученных материалов может предотвратить необратимую потерю двигательной и сенсорной функций в травмированной области, что улучшит качество жизни десятков миллионов пациентов во всем мире. Разработанные и исследованные кондуиты могут преодолеть недостатки, связанные с существующим общепринятым подходом к лечению повреждений ПНС.

Список публикаций обучающегося

1. Pryadko A.S., Yu.R. Mukhortova, R.V. Chernozem, L.E. Shlapakova, ..., R.A. Surmenev, and M.A. Surmeneva. Comprehensive Study on the Reinforcement of Electrospun PHB Scaffolds with Composite Magnetic Fe₃O₄-rGO Fillers: Structure, Physico-Mechanical Properties, and Piezoelectric Response // ACS Omega. – 2022. – Т. 7. – №. 45. – С. 41392-41411.

2. Pryadko A.S., ..., L.E. Shlapakova, R.A. Surmenev, and M.A. Surmeneva. Electrospun Magnetic Composite Poly-3-hydroxybutyrate/Magnetite Scaffolds for Biomedical Applications: Composition, Structure, Magnetic Properties, and Biological Performance // ACS Applied Bio Materials. – 2022. – Т. 5. – №. 8. – С. 3999-4019.

3. Шлапакова Л.Е., Прядко А.С., Сурменова М.А., Сурменев Р.А. Структура, физико-механические свойства и пьезоэлектрический отклик скэффолдов на основе полиоксибутирата с композитным наполнителем магнетит/восстановленный оксид графена // Известия РАН. Серия физическая. – 2023. – Т. 87. – №. 6. – С. 766–772.

4. Шлапакова Л. Е., Чернозем Р. В., Прядко А., Парий И., Сурменова М. А. Изучение структуры и физико-механических свойств скэффолдов на основе ПОА и магнетита после биодegradации *in vitro* // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера: в 2 т., Томск, 16-19 Мая 2022. - Томск: ТПУ, 2022 - Т. 2 - С. 496-497.

5. Шлапакова Л.Е., Чернозем Р.В., Прядко А.С., Сурменова М.А. Изучение структуры и физико-механических свойств скэффолдов на основе поли-3-оксибутирата и магнетита после биодegradации *in vitro* // IX Международная молодежная научная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения профессора С.П. Распопина, Екатеринбург, 16-20 мая 2022. - Екатеринбург: УрФУ, 2022 - С. 819-821.

6. Шлапакова Л.Е., Парий И., Прядко А.С., Сурменова М.А., Чернозем Р.В. Изучение структуры и физико-механических свойств скэффолдов на основе поли-3-оксибутирата и магнетита после биодegradации *in vitro* // 60-ая Международная научная студенческая конференция, Новосибирск, 10-20 апреля 2022. - Новосибирск: НГУ, 2022 - С. 221-222.

7. Шлапакова Л.Е., Прядко А.С., Чернозем Р.В., Мухортова Ю.Р., Сурменова М.А. Структура, механические и магнитные свойства скэффолдов на основе полиоксибутирата с композитным наполнителем магнетит/восстановленный оксид графена // Всероссийская научная конференция «Перспективные материалы и высокоэффективные процессы обработки», 18-19 мая 2022. - Саратов: СГТУ, 2022 - С. 257-260.

8. Шлапакова Л. Е., Сурменова М. А. Структура, физико-механические и магнитные свойства магнитоактивных кондуитов для инженерии нервной ткани // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых: в 2 т., Томск, 15-19 Мая 2023. - Томск: ТПУ, 2023 - Т. 2 - С. 602-603.

9. Прядко А.С., Шлапакова Л. Е., Мухортова Ю.Р., Сурменова М. А. Исследование биосовместимости магнитных матриц на основе полиоксибутирата полученных методом электроформования // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых: в 2 т., Томск, 15-19 Мая 2023. - Томск: ТПУ, 2023 - Т. 2 - С. 550-551.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Lee, S., M. Patel, and R. Patel, Electrospun nanofiber nerve guidance conduits for peripheral nerve regeneration: A review. *European Polymer Journal*, 2022. **181**: p. 111663.
2. Zarrintaj, P., et al., Conductive biomaterials as nerve conduits: Recent advances and future challenges. *Applied Materials Today*, 2020. **20**: p. 100784.
3. Behtaj, S., J.A.K. Ekberg, and J.A. St John, Advances in Electrospun Nerve Guidance Conduits for Engineering Neural Regeneration. *Pharmaceutics*, 2022. **14**(2).
4. Houshyar, S., A. Bhattacharyya, and R. Shanks, Peripheral Nerve Conduit: Materials and Structures. *ACS Chemical Neuroscience*, 2019. **10**(8): p. 3349-3365.
5. Журбин, Е., et al., Возможности ультразвукового исследования при травматических повреждениях периферических нервов конечностей. *Российский электронный журнал лучевой диагностики*, 2017. **7**(3): p. 127-134.
6. Koller, M., Biodegradable and Biocompatible Polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious Microbial Macromolecules for Pharmaceutical and Therapeutic Applications. *Molecules*, 2018. **23**(2).
7. Pozzobon, L.G., et al., Development of a conduit of PLGA-gelatin aligned nanofibers produced by electrospinning for peripheral nerve regeneration. *Chemico-Biological Interactions*, 2021. **348**: p. 109621.
8. Chen, X., et al., Electrospinning Multilayered Scaffolds Loaded with Melatonin and Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles for Peripheral Nerve Regeneration. *Advanced Functional Materials*, 2020. **30**(38): p. 2004537.
9. Wang, J., et al., In vitro and in vivo studies of electroactive reduced graphene oxide-modified nanofiber scaffolds for peripheral nerve regeneration. *Acta Biomaterialia*, 2019. **84**: p. 98-113.
10. Johnson, C.D.L., et al., Injectable, Magnetically Orienting Electrospun Fiber Conduits for Neuron Guidance. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019. **11**(1): p. 356-372.
11. Lizarraga-Valderrama, L.R., et al., Unidirectional neuronal cell growth and differentiation on aligned polyhydroxyalkanoate blend microfibrils with varying diameters. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2019. **13**(9): p. 1581-1594.
12. Castro, V.O. and C. Merlini, Aligned electrospun nerve conduits with electrical activity as a strategy for peripheral nerve regeneration. *Artificial Organs*, 2021. **45**(8): p. 813-818.
13. Quan, Q., et al., Aligned fibers enhance nerve guide conduits when bridging peripheral nerve defects focused on early repair stage. *Neural Regeneration Research*, 2019. **14**(5).
14. Wu, S., et al., Aligned fibrous PVDF-TrFE scaffolds with Schwann cells support neurite extension and myelination in vitro. *Journal of Neural Engineering*, 2018. **15**(5): p. 056010.
15. Karimi Tar, A., et al., Biodegradation and cellular evaluation of aligned and random poly(3-hydroxybutyrate)/chitosan electrospun scaffold for nerve tissue engineering applications. *Materials Technology*, 2020. **35**(2): p. 92-101.
16. Prabhakaran, M.P., E. Vatankhah, and S. Ramakrishna, Electrospun aligned PHBV/collagen nanofibers as substrates for nerve tissue engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013. **110**(10): p. 2775-2784.
17. Lee, Y.-S., G. Collins, and T. Livingston Arinzeh, Neurite extension of primary neurons on electrospun piezoelectric scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 2011. **7**(11): p. 3877-3886.
18. Lee, Y.-S., et al., Enhanced noradrenergic axon regeneration into schwann cell-filled PVDF-TrFE conduits after complete spinal cord transection. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017. **114**(2): p. 444-456.
19. Hu, F., et al., Neuronally differentiated adipose-derived stem cells and aligned PHBV nanofiber nerve scaffolds promote sciatic nerve regeneration. (1090-2104 (Electronic)).

20. Huang, L., et al., A compound scaffold with uniform longitudinally oriented guidance cues and a porous sheath promotes peripheral nerve regeneration in vivo. *Acta Biomaterialia*, 2018. **68**: p. 223-236.
21. Lee, B.-K., et al., End-to-side neurorrhaphy using an electrospun PCL/collagen nerve conduit for complex peripheral motor nerve regeneration. *Biomaterials*, 2012. **33**(35): p. 9027-9036.
22. Chen, Z., et al., NSC-derived extracellular matrix-modified GelMA hydrogel fibrous scaffolds for spinal cord injury repair. *NPG Asia Materials*, 2022. **14**(1): p. 20.
23. Karimi, S., et al., Alginate-magnetic short nanofibers 3D composite hydrogel enhances the encapsulated human olfactory mucosa stem cells bioactivity for potential nerve regeneration application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021. **167**: p. 796-806.
24. Liu, Z., et al., A magnetically responsive nanocomposite scaffold combined with Schwann cells promotes sciatic nerve regeneration upon exposure to magnetic field. (1178-2013 (Electronic)).
25. Funnell, J.L., et al., Assessing the combination of magnetic field stimulation, iron oxide nanoparticles, and aligned electrospun fibers for promoting neurite outgrowth from dorsal root ganglia in vitro. *Acta Biomaterialia*, 2021. **131**: p. 302-313.
26. Wang, H.B., et al., Varying the diameter of aligned electrospun fibers alters neurite outgrowth and Schwann cell migration. *Acta Biomaterialia*, 2010. **6**(8): p. 2970-2978.
27. Zuidema, J.M., et al., Magnetic NGF-Releasing PLLA/Iron Oxide Nanoparticles Direct Extending Neurites and Preferentially Guide Neurites along Aligned Electrospun Microfibers. *ACS Chemical Neuroscience*, 2015. **6**(11): p. 1781-1788.
28. Hu, F., et al., Neuronally differentiated adipose-derived stem cells and aligned PHBV nanofiber nerve scaffolds promote sciatic nerve regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017. **489**(2): p. 171-178.
29. Orkwis, J.A., et al., Mechanical stimulation of a bioactive, functionalized PVDF-TrFE scaffold provides electrical signaling for nerve repair applications. *Biomaterials Advances*, 2022. **140**: p. 213081.
30. Cheng, Y., et al., 3D structured self-powered PVDF/PCL scaffolds for peripheral nerve regeneration. *Nano Energy*, 2020. **69**: p. 104411.
31. Li, Y., et al., Developments of Advanced Electrospinning Techniques: A Critical Review. *Advanced Materials Technologies*, 2021. **6**(11): p. 2100410.
32. Chorsi, M.T., et al., Piezoelectric Biomaterials for Sensors and Actuators. *Advanced Materials*, 2019. **31**(1): p. 1802084.
33. Ma, Y., et al., Piezoelectric conduit combined with multi-channel conductive scaffold for peripheral nerve regeneration. *Chemical Engineering Journal*, 2023. **452**: p. 139424.
34. Koppes, A.N., A.M. Seggio, and D.M. Thompson, Neurite outgrowth is significantly increased by the simultaneous presentation of Schwann cells and moderate exogenous electric fields. *Journal of neural engineering*, 2011. **8**(4): p. 046023.
35. Koppes, A.N., et al., Neurite outgrowth on electrospun PLLA fibers is enhanced by exogenous electrical stimulation. *Journal of neural engineering*, 2014. **11**(4): p. 046002.
36. Liang, Z., et al., A simple electrical stimulation cell culture system on the myelination of dorsal root ganglia and Schwann cells. *Biotechniques*, 2019. **67**(1): p. 11-15.
37. Aebischer, P., et al., Piezoelectric guidance channels enhance regeneration in the mouse sciatic nerve after axotomy. *Brain Research*, 1987. **436**(1): p. 165-168.
38. Wu, P., et al., Ultrasound-driven in vivo electrical stimulation based on biodegradable piezoelectric nanogenerators for enhancing and monitoring the nerve tissue repair. *Nano Energy*, 2022. **102**: p. 107707.
39. Yang, Y., et al., Engineering a wirelessly self-powered and electroconductive scaffold to promote peripheral nerve regeneration. *Nano Energy*, 2023. **107**: p. 108145.

40. Jing, W., et al., Study of electrical stimulation with different electric-field intensities in the regulation of the differentiation of PC12 cells. *ACS chemical neuroscience*, 2018. **10**(1): p. 348-357.
41. Guo, W., et al., Self-powered electrical stimulation for enhancing neural differentiation of mesenchymal stem cells on graphene–poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) hybrid microfibers. *ACS nano*, 2016. **10**(5): p. 5086-5095.
42. Gordon, T. and A.W. English, Strategies to promote peripheral nerve regeneration: electrical stimulation and/or exercise. *European Journal of Neuroscience*, 2016. **43**(3): p. 336-350.
43. Liu, Q. and B. Song, Electric field regulated signaling pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2014. **55**: p. 264-268.
44. Pires, F., et al., Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2015. **1850**(6): p. 1158-1168.
45. Kim, S., et al., Electrically conductive polydopamine–polypyrrole as high performance biomaterials for cell stimulation in vitro and electrical signal recording in vivo. *ACS applied materials & interfaces*, 2018. **10**(39): p. 33032-33042.
46. Yu, A.-P., et al., Comparative effects of implanted electrodes with differing contact patterns on peripheral nerve regeneration and functional recovery. *Neuroscience Research*, 2019. **145**: p. 22-29.
47. Marino, A., et al., Piezoelectric nanotransducers: The future of neural stimulation. *Nano Today*, 2017. **14**: p. 9-12.
48. Chen, P., et al., Ultrasound-driven electrical stimulation of peripheral nerves based on implantable piezoelectric thin film nanogenerators. *Nano Energy*, 2021. **86**: p. 106123.
49. Tai, Y., et al., Modulation of piezoelectric properties in electrospun PLLA nanofibers for application-specific self-powered stem cell culture platforms. *Nano Energy*, 2021. **89**: p. 106444.
50. Zhang, X., et al., Piezoelectric nanotopography induced neuron-like differentiation of stem cells. *Advanced Functional Materials*, 2019. **29**(22): p. 1900372.
51. Liu, Z., et al., Cell-Traction-Triggered On-Demand Electrical Stimulation for Neuron-Like Differentiation. *Advanced Materials*, 2021. **33**(51): p. 2106317.
52. Xia, G., et al., Piezoelectric charge induced hydrophilic poly(L-lactic acid) nanofiber for electro-topographical stimulation enabling stem cell differentiation and expansion. *Nano Energy*, 2022. **102**: p. 107690.
53. Zhang, Y., et al., Magnetolectric nanoparticles incorporated biomimetic matrix for wireless electrical stimulation and nerve regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, 2021. **10**(16): p. 2100695.
54. Orkwis, J.A., et al., Development of a Piezoelectric PVDF-TrFE Fibrous Scaffold to Guide Cell Adhesion, Proliferation, and Alignment. *Macromolecular Bioscience*, 2020. **20**(9): p. 2000197.
55. Javidi, H., et al., Preparation and characterization of self-stimuli conductive nerve regeneration conduit using co-electrospun nanofibers filled with gelatin-chitosan hydrogels containing polyaniline-graphene-ZnO nanoparticles. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2022: p. 1-11.
56. Mohseni, M., et al., Preparation and characterization of self-electrical stimuli conductive gellan based nano scaffold for nerve regeneration containing chopped short spun nanofibers of PVDF/MCM41 and polyaniline/graphene nanoparticles: Physical, mechanical and morphological studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021. **167**: p. 881-893.

57. Chen, X.-Z., et al., Magnetically driven piezoelectric soft microswimmers for neuron-like cell delivery and neuronal differentiation. *Materials Horizons*, 2019. **6**(7): p. 1512-1516.
58. Zhang, R., et al., Ultrasonic-driven electrical signal-iron ion synergistic stimulation based on piezotronics induced neural differentiation of mesenchymal stem cells on FeOOH/PVDF nanofibrous hybrid membrane. *Nano Energy*, 2021. **87**: p. 106192.
59. Genchi, G.G., et al., P (VDF-TrFE)/BaTiO₃ nanoparticle composite films mediate piezoelectric stimulation and promote differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Advanced healthcare materials*, 2016. **5**(14): p. 1808-1820.
60. Fine, E.G., et al., Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidene fluoride-trifluoroethylene copolymer guidance channels. *Biomaterials*, 1991. **12**(8): p. 775-780.
61. Huang, N.F., R.J. Lee, and S. Li, Engineering of aligned skeletal muscle by micropatterning. *American journal of translational research*, 2010. **2**(1): p. 43.
62. Hoop, M., et al., Ultrasound-mediated piezoelectric differentiation of neuron-like PC12 cells on PVDF membranes. *Scientific reports*, 2017. **7**(1): p. 1-8.
63. Xie, H., et al., Enhanced proliferation and differentiation of neural stem cells grown on PHA films coated with recombinant fusion proteins. *Acta Biomaterialia*, 2013. **9**(8): p. 7845-7854.
64. Mohanna, P.-N., G. Terenghi, and M. Wiberg, Composite PHB-GGF conduit for long nerve gap repair: a long-term evaluation. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery*, 2005. **39**(3): p. 129-137.
65. Bian, Y.-Z., et al., Evaluation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 2009. **30**(2): p. 217-225.
66. Hinüber, C., et al., Hierarchically structured nerve guidance channels based on poly-3-hydroxybutyrate enhance oriented axonal outgrowth. (1878-7568 (Electronic)).
67. Anjum, A., et al., Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. *International journal of biological macromolecules*, 2016. **89**: p. 161-174.
68. Suwantong, O., et al., In vitro biocompatibility of electrospun poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007. **40**(3): p. 217-223.
69. Masaeli, E., et al., Fabrication, Characterization and Cellular Compatibility of Poly(Hydroxy Alkanoate) Composite Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering. *PLOS ONE*, 2013. **8**(2): p. e57157.
70. Karimi, A., et al., Poly(hydroxybutyrate)/chitosan Aligned Electrospun Scaffold as a Novel Substrate for Nerve Tissue Engineering. (2277-9175 (Print)).
71. Masaeli, E., et al., Peptide functionalized polyhydroxyalkanoate nanofibrous scaffolds enhance Schwann cells activity. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 2014. **10**(7): p. 1559-1569.
72. Ozer, H., et al., Regenerative potential of chitosan-coated poly-3-hydroxybutyrate conduits seeded with mesenchymal stem cells in a rat sciatic nerve injury model. *International Journal of Neuroscience*, 2018. **128**(9): p. 828-834.
73. Heidari-Keshel, S., et al., Surface modification of Poly Hydroxybutyrate (PHB) nanofibrous mat by collagen protein and its cellular study. *Materials Technology*, 2016. **31**(13): p. 799-805.
74. Mohanna, P.N., et al., A composite poly-hydroxybutyrate–glial growth factor conduit for long nerve gap repairs. *Journal of Anatomy*, 2003. **203**(6): p. 553-565.
75. Novikova, L.N., et al., Biodegradable poly-β-hydroxybutyrate scaffold seeded with Schwann cells to promote spinal cord repair. *Biomaterials*, 2008. **29**(9): p. 1198-1206.
76. Armstrong, S.J., et al., ECM molecules mediate both Schwann cell proliferation and activation to enhance neurite outgrowth. *Tissue engineering*, 2007. **13**(12): p. 2863-2870.

77. Sakar, M., et al., The effect of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)(PHBHHx) and human mesenchymal stem cell (hMSC) on axonal regeneration in experimental sciatic nerve damage. *International Journal of Neuroscience*, 2014. **124**(9): p. 685-696.
78. Kalbermatten, D.F., et al., Schwann cell strip for peripheral nerve repair. *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, 2008. **33**(5): p. 587-594.
79. Hart, A.M., M. Wiberg, and G. Terenghi, Exogenous leukaemia inhibitory factor enhances nerve regeneration after late secondary repair using a bioartificial nerve conduit. *British journal of plastic surgery*, 2003. **56**(5): p. 444-450.
80. Hazari, A., et al., A resorbable nerve conduit as an alternative to nerve autograft in nerve gap repair. *British journal of plastic surgery*, 1999. **52**(8): p. 653-657.
81. Mosahebi, A., M. Wiberg, and G. Terenghi, Addition of fibronectin to alginate matrix improves peripheral nerve regeneration in tissue-engineered conduits. *Tissue engineering*, 2003. **9**(2): p. 209-218.
82. Young, R.C., G. Terenghi, and M. Wiberg, Poly-3-hydroxybutyrate (PHB): a resorbable conduit for long-gap repair in peripheral nerves. *British journal of plastic surgery*, 2002. **55**(3): p. 235-240.
83. De Sousa, M.E., et al., Stability and relaxation mechanisms of citric acid coated magnetite nanoparticles for magnetic hyperthermia. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2013. **117**(10): p. 5436-5445.
84. Liu, J., C. Dai, and Y. Hu, Aqueous aggregation behavior of citric acid coated magnetite nanoparticles: effects of pH, cations, anions, and humic acid. *Environmental research*, 2018. **161**: p. 49-60.
85. Li, L., et al., Effect of synthesis conditions on the properties of citric-acid coated iron oxide nanoparticles. *Microelectronic Engineering*, 2013. **110**: p. 329-334.
86. Yang, K., et al., Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Applied Surface Science*, 2010. **256**(10): p. 3093-3097.
87. Bonartsev, A.P., et al., Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by *Azotobacter chroococcum* 7B: A precursor feeding strategy. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2017. **47**(2): p. 173-184.
88. Chernozem, R.V., et al., A comprehensive study of the structure and piezoelectric response of biodegradable polyhydroxybutyrate-based films for tissue engineering applications. *Polymer Journal*, 2022.
89. Kareem, M.M. and K.E. Tanner, Optimising micro-hydroxyapatite reinforced poly(lactide acid) electrospun scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2020. **31**(4): p. 38.
90. Surmenev, R.A., et al., The effect of different sizes of cross-linked fibers of biodegradable electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffolds on osteogenic behavior in a rat model in vivo. *Journal of Applied Polymer Science*, 2022. **139**(22): p. 52244.
91. Wypych, G., 2. FILLERS – ORIGIN, CHEMICAL COMPOSITION, PROPERTIES, AND MORPHOLOGY. 2016.
92. Cullity, B.D., *Elements of X-ray Diffraction*. 1956: Addison-Wesley Publishing.
93. Chen, L. and M. Wang, Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB–PHV copolymer. *Biomaterials*, 2002. **23**(13): p. 2631-2639.
94. Yucel, D., G.T. Kose, and V. Hasirci, Polyester based nerve guidance conduit design. *Biomaterials*, 2010. **31**(7): p. 1596-1603.
95. Nejad, M.R., M. Yousefzadeh, and A. Solouk, Electrospun PET/PCL small diameter nanofibrous conduit for biomedical application. *Materials Science And Engineering: C*, 2020. **110**: p. 110692.

96. Jafari, S., et al., Electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibrous conduit for biomedical application. *Polymers for Advanced Technologies*, 2020. **31**(2): p. 284-296.
97. Thomas, V., et al., Electrospinning of Biosyn®-based tubular conduits: Structural, morphological, and mechanical characterizations. *Acta biomaterialia*, 2011. **7**(5): p. 2070-2079.
98. Kreslin, V.Y. and E. Naiden, Automatic complex for a study of the characteristics of hard magnetic materials. *Instruments and Experimental Techniques*, 2002. **45**(1): p. 55-57.
99. Huhtamäki, T., et al., Surface-wetting characterization using contact-angle measurements. *Nature Protocols*, 2018. **13**(7): p. 1521-1538.
100. Das, S., et al., In vivo studies of silk based gold nano-composite conduits for functional peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 2015. **62**: p. 66-75.
101. Beigi, M.-H., et al., In vivo integration of poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous nerve guide seeded with teeth derived stem cells for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2014. **102**(12): p. 4554-4567.
102. Wu, X., et al., Functional self-assembling peptide nanofiber hydrogel for peripheral nerve regeneration. *Regenerative Biomaterials*, 2017. **4**(1): p. 21-30.
103. Hurtado, A., et al., Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-L-lactic acid microfibers. (1878-5905 (Electronic)).
104. Christopherson, G.T., H. Song, and H.-Q. Mao, The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials*, 2009. **30**(4): p. 556-564.
105. Lee, N.M., et al., Polymer fiber-based models of connective tissue repair and healing. *Biomaterials*, 2017. **112**: p. 303-312.
106. Meehan, S. and Amrinder S. Nain, Role of Suspended Fiber Structural Stiffness and Curvature on Single-Cell Migration, Nucleus Shape, and Focal-Adhesion-Cluster Length. *Biophysical Journal*, 2014. **107**(11): p. 2604-2611.
107. Schaub, N.J., et al., Engineered Nanotopography on Electrospun PLLA Microfibers Modifies RAW 264.7 Cell Response. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2013. **5**(20): p. 10173-10184.
108. Liu, C., et al., Growth of anisotropic single crystals of a random copolymer, poly [(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate] driven by cooperative-CH \cdots O H-bonding. *Polymer*, 2018. **154**: p. 111-118.
109. Sun, X., et al., Effects of Molar Mass of Poly (l-lactide acid) on the Crystallization of Poly [(R)-3-hydroxybutyrate] in Their Ultrathin Blend Films. *Macromolecules*, 2012. **45**(5): p. 2485-2493.
110. Phongtamrug, S. and K. Tashiro, X-ray Crystal Structure Analysis of Poly(3-hydroxybutyrate) β -Form and the Proposition of a Mechanism of the Stress-Induced α -to- β Phase Transition. *Macromolecules*, 2019. **52**(8): p. 2995-3009.
111. Perret, E., et al., Structural response of melt-spun poly(3-hydroxybutyrate) fibers to stress and temperature. *Polymer*, 2020. **197**: p. 122503.
112. Perret, E., et al., Tensile study of melt-spun poly(3-hydroxybutyrate) P3HB fibers: Reversible transformation of a highly oriented phase. *Polymer*, 2019. **180**: p. 121668.
113. Chernozem, R.V., et al., Enhanced piezoresponse and surface electric potential of hybrid biodegradable polyhydroxybutyrate scaffolds functionalized with reduced graphene oxide for tissue engineering. *Nano Energy*, 2021. **89**: p. 106473.
114. Mukhortova, Y.R., et al., Fabrication and characterization of a magnetic biocomposite of magnetite nanoparticles and reduced graphene oxide for biomedical applications. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 2022. **29**: p. 100843.
115. Atrei, A., B. Lesiak-Orlowska, and J. Tóth, Magnetite nanoparticles functionalized with citrate: A surface science study by XPS and ToF-SIMS. *Applied Surface Science*, 2022. **602**: p. 154366.

116. Pryadko, A.S., et al., Core-Shell Magnetoactive PHB/Gelatin/Magnetite Composite Electrospun Scaffolds for Biomedical Applications. *Polymers*, 2022. **14**(3): p. 529.
117. Pryadko A, A.S., et al., Electrospun Magnetic Composite Poly-3-hydroxybutyrate/Magnetite Scaffolds for Biomedical Applications: Composition, Structure, Magnetic Properties, and Biological Performance. *ACS Applied Bio Materials*, 2022. **5**(8): p. 3999-4019.
118. Izumi, C.M.S. and M.L.A. Temperini, FT-Raman investigation of biodegradable polymers: Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Vibrational Spectroscopy*, 2010. **54**(2): p. 127-132.
119. Furukawa, T., et al., Raman microspectroscopy study of structure, dispersibility, and crystallinity of poly(hydroxybutyrate)/poly(l-lactic acid) blends. *Polymer*, 2006. **47**(9): p. 3132-3140.
120. Manafi, P., et al., Non-isothermal crystallization kinetics assessment of poly(lactic acid)/graphene nanocomposites. *Iranian Polymer Journal*, 2017. **26**(5): p. 377-389.
121. Wang, L.-N., P.-Y. Guo Wang, and J.-C. Wei, Graphene Oxide-Graft-Poly(l-lactide)/Poly(l-lactide) Nanocomposites: Mechanical and Thermal Properties. *Polymers*, 2017. **9**(9).
122. Zhang, S., et al., Preparation of poly(vinyl alcohol)-grafted graphene oxide/poly(vinyl alcohol) nanocomposites via in-situ low-temperature emulsion polymerization and their thermal and mechanical characterization. *Applied Surface Science*, 2017. **396**: p. 1098-1107.
123. Ming, Y., et al., Polymer Nanocomposites: Role of modified filler content and interfacial interaction on crystallization. *European Polymer Journal*, 2022. **162**: p. 110894.
124. Tang, C.Y., et al., Nonisothermal melt-crystallization kinetics of hydroxyapatite-filled poly(3-hydroxybutyrate) composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 2006. **102**(6): p. 5388-5395.
125. Chen, D.Z., et al., Dynamic mechanical properties and in vitro bioactivity of PHBHV/HA nanocomposite. *Composites Science and Technology*, 2007. **67**(7-8): p. 1617-1626.
126. Ho, M.H., et al., The Morphology and Degradation Behavior of Electrospun Poly(3-hydroxybutyrate)/Magnetite and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/Magnetite Composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 2014. **131**(22).
127. Zhuikov, V.A., et al., Mechanics and surface ultrastructure changes of poly(3-hydroxybutyrate) films during enzymatic degradation in pancreatic lipase solution. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 2017. **648**(1): p. 236-243.
128. Chen, Z., et al., Enzymatic degradation behaviors and kinetics of bio-degradable jute/poly(lactic acid) (PLA) composites. *Composites Communications*, 2022. **33**: p. 101227.
129. Wellen, R.M., et al., The melting behaviour of poly (3-hydroxybutyrate) by DSC. Reproducibility study. *Polymer testing*, 2013. **32**(2): p. 215-220.
130. Hong, S.-G., H.-W. Hsu, and M.-T. Ye, Thermal properties and applications of low molecular weight polyhydroxybutyrate. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 2013. **111**(2): p. 1243-1250.
131. Duffy, P., et al., Synthetic bioresorbable poly- α -hydroxyesters as peripheral nerve guidance conduits; a review of material properties, design strategies and their efficacy to date. *Biomaterials science*, 2019. **7**(12): p. 4912-4943.
132. Yin, Y.Y., et al., Lipase-catalyzed laurate esterification of cellulose nanocrystals and their use as reinforcement in PLA composites. *Cellulose*, 2020. **27**(11): p. 6263-6273.
133. Zhang, X.F., et al., Time-dependent evaluation of mechanical properties and in vitro cytocompatibility of experimental composite-based nerve guidance conduits. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2011. **4**(7): p. 1266-1274.

134. Borschel, G.H., et al., Mechanical properties of acellular peripheral nerve. *Journal of Surgical Research*, 2003. **114**(2): p. 133-139.
135. Dinis, T.M., et al., 3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 2015. **41**: p. 43-55.
136. Singh, A., et al., Mechanical properties of spinal nerve roots subjected to tension at different strain rates. *Journal of Biomechanics*, 2006. **39**(9): p. 1669-1676.
137. Liu, G., et al., Stress and strain analysis on the anastomosis site sutured with either epineurial or perineurial sutures after simulation of sciatic nerve injury. *Neural regeneration research*, 2012. **7**(29): p. 2299.
138. Kerns, J., et al., Mechanical properties of the human tibial and peroneal nerves following stretch with histological correlations. *The Anatomical Record*, 2019. **302**(11): p. 2030-2039.
139. Rydevik, B.L., et al., An in vitro mechanical and histological study of acute stretching on rabbit tibial nerve. *Journal of Orthopaedic Research*, 1990. **8**(5): p. 694-701.
140. Smit, J. and H.P.J. Wijn Ferrites : Physical Properties of Ferrimagnetic Oxides in Relation to Their Technical Applications. 1959, Philips Technical Library : Eindhoven: Netherlands. p. 232-272.
141. Lu, A.-H., E.L. Salabas, and F. Schüth, Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007. **46**(8): p. 1222-1244.
142. Kodama, R.H., Magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1999. **200**: p. 359-372.
143. Krautz, M., et al., Hysteretic behavior of soft magnetic elastomer composites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2017. **426**: p. 60-63.
144. Wang, N., et al., Fabrication and characterization of bioactive β -Ca₂SiO₄/PHBV composite scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 2013. **33**(4): p. 2294-2301.
145. Sousa, I., et al., Collagen surface modified poly(ϵ -caprolactone) scaffolds with improved hydrophilicity and cell adhesion properties. *Materials Letters*, 2014. **134**: p. 263-267.
146. Bhattacharjee, A., et al., Fabrication and characterization of Pluronic modified poly(hydroxybutyrate) fibers for potential wound dressing applications. *Materials Science and Engineering: C*, 2016. **63**: p. 266-273.
147. Karahaliloğlu, Z., Cell-compatible PHB/silk fibroin composite nanofiber mat for tissue engineering applications. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*, 2017. **41**: p. 503-513.
148. Kurusu, R.S. and N.R. Demarquette, Surface modification to control the water wettability of electrospun mats. *International Materials Reviews*, 2019. **64**(5): p. 249-287.
149. Ding, Y., et al., Electrospun Polyhydroxybutyrate/Poly(ϵ -caprolactone)/58S Sol-Gel Bioactive Glass Hybrid Scaffolds with Highly Improved Osteogenic Potential for Bone Tissue Engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016. **8**(27): p. 17098-17108.
150. Si, J., et al., Biomimetic composite scaffolds based on mineralization of hydroxyapatite on electrospun poly(ϵ -caprolactone)/nanocellulose fibers. *Carbohydrate Polymers*, 2016. **143**: p. 270-278.
151. Jang, W., et al., PVdF/graphene oxide hybrid membranes via electrospinning for water treatment applications. *RSC Advances*, 2015. **5**(58): p. 46711-46717.
152. Zhang, C., et al., Incorporation of poly(ethylene glycol) grafted cellulose nanocrystals in poly(lactic acid) electrospun nanocomposite fibers as potential scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 2015. **49**: p. 463-471.
153. Zhang, C., et al., The surface grafting of graphene oxide with poly(ethylene glycol) as a reinforcement for poly(lactic acid) nanocomposite scaffolds for potential tissue engineering applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2016. **53**: p. 403-413.

154. Wang, J., et al., Influence of surface roughness on contact angle hysteresis and spreading work. *Colloid and Polymer Science*, 2020. **298**(8): p. 1107-1112.
155. Veeramasaneni, S., et al., Hydrophobicity of ion-plated PTFE coatings. *Progress in Organic Coatings*, 1997. **31**(3): p. 265-270.
156. Onda, T., et al., Super-Water-Repellent Fractal Surfaces. *Langmuir*, 1996. **12**(9): p. 2125-2127.
157. Chau, T.T., et al., A review of factors that affect contact angle and implications for flotation practice. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2009. **150**(2): p. 106-115.
158. Johnson, R.E., Jr. and R.H. Dettre, Contact Angle Hysteresis, in *Contact Angle, Wettability, and Adhesion*. 1964, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. p. 112-135.
159. Miwa, M., et al., Effects of the Surface Roughness on Sliding Angles of Water Droplets on Superhydrophobic Surfaces. *Langmuir*, 2000. **16**(13): p. 5754-5760.
160. Encinas, N., et al., Control of Wettability of Polymers by Surface Roughness Modification. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 2010. **24**(11-12): p. 1869-1883.
161. Kubiak, K.J., et al., Wettability versus roughness of engineering surfaces. *Wear*, 2011. **271**(3): p. 523-528.
162. Ramón-Torregrosa, P.J., et al., Factors affecting the measurement of roughness factor of surfaces and its implications for wetting studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008. **323**(1): p. 83-93.
163. Mohammad Karim, A., J.P. Rothstein, and H.P. Kavehpour, Experimental study of dynamic contact angles on rough hydrophobic surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2018. **513**: p. 658-665.
164. Meng, J., et al., Paramagnetic nanofibrous composite films enhance the osteogenic responses of pre-osteoblast cells. *Nanoscale*, 2010. **2**(12): p. 2565-2569.
165. Cai, Q., et al., Osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells on poly(l-lactide)/Fe₃O₄ nanofibers with static magnetic field exposure. *Materials Science and Engineering: C*, 2015. **55**: p. 166-173.
166. Hao, L., et al., Synergistic osteogenesis promoted by magnetically actuated nanomechanical stimuli. *Nanoscale*, 2019. **11**(48): p. 23423-23437.
167. Russo, T., et al., Combination Design of Time-Dependent Magnetic Field and Magnetic Nanocomposites to Guide Cell Behavior. *Nanomaterials*, 2020. **10**(3).
168. Paun, I.A., et al., 3D Biomimetic Magnetic Structures for Static Magnetic Field Stimulation of Osteogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018. **19**(2).
169. Huang, J., et al., Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by magnetic nanoparticle composite scaffolds under a pulsed electromagnetic field. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017. **25**(4): p. 575-579.
170. Hao, S., et al., Macrophage phenotypic mechanomodulation of enhancing bone regeneration by superparamagnetic scaffold upon magnetization. (1878-5905 (Electronic)).
171. Boda, S.K., G. Thirivikraman, and B. Basu, Magnetic field assisted stem cell differentiation – role of substrate magnetization in osteogenesis. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015. **3**(16): p. 3150-3168.
172. Amini, S. and M.K. White, *Neuronal Cell Culture Methods and Protocols*.
173. Lee, J.-Y., et al., The Effect of Collagen Nerve Conduits Filled with Collagen-Glycosaminoglycan Matrix on Peripheral Motor Nerve Regeneration in a Rat Model. 2020: p. 6.
174. Официальный сайт Томского политехнического университета. Экономическое управление.; Available from: <https://tpu.ru/university/structure/department/view/?id=8946>.
175. ГОСТ 12.2.033-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ стоя. Общие эргономические требования; введ. 01.01.79. - М.: Изд-во стандартов, 1979. - 9 с.

176. СанПиН 2.2.2/2.4.1340-03. Гигиенические требования к персональным электронно-вычислительным машинам и организации работы.
177. ГОСТ 12.2.032-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования.
178. ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ «Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов».
179. ГОСТ 12.1.019-2017 ССБТ «Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».
180. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности
181. ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны».
182. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».
183. Безопасность жизнедеятельности: учебное пособие / О.Б. Назаренко, Ю.А. Амелькович. — Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2013. — 178 с.
184. ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
185. СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания" (с изменениями на 30 декабря 2022 года).
186. ГОСТ 12.2.003-91 ССБТ «Оборудование производственное. Общие требования безопасности».
187. ГОСТ 12.1.029-80 ССБТ «Средства и методы защиты от шума. Классификация».

Приложение А

1 Literature review

Обучающийся:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
9ДМ11	Шлапакова Лада Евгеньевна		

Консультант ИШХБМТ:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Сурменев Р.А.	д.т.н., доцент		

Консультант – лингвист ОИЯ ШБИП:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Гончарова Л.А.	к.п.н.		

1.1 General requirements for nerve scaffold design

1.1.1 Biocompatibility and biodegradability

A number of requirements should be considered while designing NGCs to maximize their efficiency. Primarily, a nerve scaffold must be biocompatible, *i.e.* not cause any mutagenic, carcinogenic, and cytotoxic effects or inflammatory responses. Importantly, a NGC must be biodegradable, so as it resorbs in the body with the rate consistent with that of the nerve restoration. After the implant is sutured at the nerve stumps, the biodegradable scaffold can be populated and remodeled by neuronal cells and eventually replaced by native tissue; hence, the original function can be restored without the need of a second surgery. Biodegradation rate is a critical parameter of a NGC, since it must provide sufficient support for nerve tissues throughout the whole regeneration period. Therefore, a relatively slow degradation rate is preferable. Numerous biodegradable polymers have been utilized for nerve scaffolds construction, both natural (gelatin [32-34], chitosan [15, 35-37], silk fibroin [12, 38], collagen [39, 40]), and synthetic (PCL [41-43], PLLA [44-46], PLGA [32], PHAs [35, 47-49], and other). Natural polymers are known to degrade rapidly. For example, the addition of up to 20 wt. % of chitosan to PHB nerve scaffolds increased their mass loss from 20% to 35% after 8 weeks of degradation in PBS [37]. Hinüber *et al.* [1] evaluated mechanical properties of various conduits compositions as a function of hydrolytic degradation time. During 16-week degradation the P3HB/PCL conduits were more stable than P(3HB-co-4HB) conduits. Therefore, P3HB/PCL was found more appropriate for nerve TE, while P(3HB-co-4HB) should be considered for shorter term regenerative applications [1]. Since the use of neat non-degradable polymers for NGCs is undesired, such polymers are often blended with biodegradable ones. In the research [25] non-degradable PVDF was blended with PCL to fabricate electroactive NGCs, which lost up to 9.1% of mass during 4-month period *in vivo*, which was appropriate for long-term mechanical support for nerve regrowth within the conduits.

1.1.2 Bioactivity

Biodegradable and biocompatible conduits were previously introduced, which degraded in physiological environments with no adverse effects, however acted only like tubes bridging the distal and proximal stumps and failed to provide necessary stimulatory cues for nerve regeneration process [3]. Besides biodegradability and biocompatibility, NGCs obviously need to be bioactive. Combining appropriate topographical [2, 32, 37, 50, 51], biochemical [36, 52-55], electrical [2, 52, 56-58], and magnetic [43, 50, 59] factors is a key to successful nerve repair. In this review we particularly focus on piezoelectric NGCs.

1.1.3 Morphological structure

Careful attention should be paid to the conduit size. One of the main drawbacks of conventional autografts is the mismatch between the donor nerve and the nerve defect [4, 60]. Synthetic conduits with tailored, ideally matching size became the solution of this problem; hence the dimensions of the damaged site must be taken under consideration while developing NGCs. In structure, the NGC's walls should be highly porous and permeable to allow facile transport of nutrients, metabolites, and gases from the inner lumen to the surrounding environment and vice versa. Porous structure can mimic the perineurium, which surrounds the nerve fibers and allows for transport of nutrients *in vivo* [56]. Hinüber *et al.* [1] studied the diffusion of large molecules of 70 kDa through the PHA-based conduits wall. Permeation of 50% of the molecules took less than 10 h for a wall thickness of 250 μm , which was sufficient for effective diffusion of essential nutrients and metabolites through the conduit wall [1]. In turn, PHBHHx conduits were permeable to three compounds tested including glucose, lysozyme and bovine serum albumin, indicating the suitability of the conduits for free exchanges of nutrients [61]. In contrast, in the research [62] insufficient nerve regeneration by P(VDF-TrFE) conduits was achieved, which was ascribed to the lack of permeability in the rigid melt-extruded conduits. The wall thickness is another important parameter in NGCs design. It should be enough to provide sufficient mechanical strength and stability to bear compression stress *in vivo*. Moreover, a low wall thickness increases neuroma formation [4]. On the contrary, with too thick walls nutrient and oxygen exchange between the tissue inside the conduit and the outer environment is reduced [42].

1.1.4 Sufficient strength and flexibility

As have been mentioned, porosity and permeability are important for robust nerve regeneration, while the biodegradability of NGCs allows avoiding second surgeries. At the same time NGCs must retain sufficient mechanical strength and integrity for long-term physical support and protection of the regenerating nerves. The tensile properties of nerve tissues are very flexible and ductile with high values of elongation at break from 30% to 60% and low Young's modulus. Stiffness has been previously described to direct nonhuman NSCs differentiation, with neuronal differentiation preferred on softer hydrogel matrices [63]. Most of synthetic polymers generally exhibit mechanical properties that are unsuitably strong or stiff to be comparable to nervous tissue [5]. Such polymers as PHAs, PLLA, PGA, PLGA, and PVDF present a Young's modulus which is typically orders of magnitude greater than that of the native nerve [5]. Therefore, these polymers are often blended with more ductile polymers to overcome their inherent stiffness. For example, PHB, which is intrinsically brittle and exhibits inadequate mechanical properties to meet the

requirements of NGCs [64, 65], is frequently blended with PCL, chitosan, other PHAs, *etc.* [1, 35, 37, 47] or co-polymers are used instead, such as P(3HB-co-4HB) [1], poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) [55, 61] or PHBV [40, 48, 53, 65]. Of the polyesters, only PCL-based polymers present mechanical properties which even approach those of native nerve tissue [5]. The addition of PCL was shown to improve the bending and tensile properties of PHB [1]. Furthermore, the blend of PCL with PVDF simultaneously improved mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of PVDF while retaining the desired piezoelectricity [25].

Electrospun random and aligned scaffolds for nerve TE applications based on PHBV/collagen blends have been fabricated, and their tensile properties were evaluated with different directions of the applied load [40]. The tensile strength of the electrospun nanofibers were 4.01 ± 0.27 , 2.60 ± 0.18 , and 2.17 ± 0.27 MPa, respectively for random PHBV, PHBV/Col 75:25, and PHBV/Col 50:50 nanofibers. The obvious decrease in tensile strength of the blends was due to the weak mechanical properties of the natural polymer collagen. The Young's modulus of both random and aligned nanofibers in the circumferential direction is also decreased with increasing collagen content.

Yang *et al.* [23] fabricated a composite NGC with an electrospun well-aligned nanofibrous shell with embedded CNTs/gelatin methacryloyl (GelMA) core. Such double-layer and electroconductive NGC exhibited a suitable mechanical strength of ~ 10 kPa inside, matching stiffness requirement of the natural neural tissue perfectly.

1.1.5 Fabrication methods

Numerous NGCs fabrication techniques exist, such as salt leaching, freeze-drying, dip-coating, self-assembly, solvent casting, gas foaming, 3D printing, and electrospinning (ES) [2]. The majority of these techniques have drawbacks limiting their application in NGCs manufacturing. For example, self-assembly does not provide precise control over fiber dimensions; the poor interconnectivity of pores, small pore size, and irregular porosity are the main drawbacks of both gas foaming and freeze drying [4]. The low mechanical strength limits the 3D printed scaffolds [72]. ES is a versatile, simple, low cost, and controllable technique, which can produce defect-free NGCs with precisely tailored fiber architecture, crystallinity, and physico-mechanical properties. Fibers' properties can be tuned by adjusting parameters of ES solution, process, and environment [60, 72]. For example, increasing the rotation speed of a rotating cylindrical collector results in uniformly directed aligned fibers [73]. ES allows the formation of 3D structures, which successfully mimic the native extracellular matrix (ECM). The porosity,

flexibility, and high surface area of electrospun fibrous mats can provide an enhanced environment for cell-substrate interactions.

1.1.6 Electrospun fiber diameter

It is still unclear whether microfibers or nanofibers are better for nerve TE applications. Many researchers suggest nanofibrous scaffolds for nerve regeneration due to the resemblance of their dimensions and architecture to the native ECM of neurons. However, positive results in nerve regeneration have been reported by using both nanofibers [33, 45, 48, 58, 59, 74, 75] and microfibers [34, 44, 47, 52, 73, 76-78]. Wen and Tresco [79] found good alignment and outgrowth of neurites on microfibres with diameters ranging from 30 μm (comparable with cellular size) to 5 μm . However, SCs migration and neurite outgrowth were inhibited when the diameter of the microfibres was greater than 30 μm [79]. In turn, Wang *et al.* [44] fabricated three groups of electrospun PLLA fibers (1325 \pm 383 nm, microfibers; 759 \pm 179 nm, submicrofibers; and 293 \pm 65 nm, nanofibers). Nanofibers (293 \pm 65 nm) did not promote extensive neurite extension or SCs migration; submicron fibers (759 \pm 179 nm) promoted long, directed neurite extension independent of SCs migration, while micro scaled fibers (1325 \pm 383 nm) promoted both long directed neurite extension and SCs migration [44]. Christopherson *et al.* [80] prepared electrospun polyethersulfone (PES) scaffolds with fiber diameters of 283 \pm 45, 749 \pm 153, and 1.452 \pm 0,312 nm and demonstrated the influence of fiber diameter on rNSC differentiation and proliferation. Under the differentiation condition, rNSCs showed a 40% increase in oligodendrocyte differentiation on 283-nm fibers and 20% increase in neuronal differentiation on 749-nm fibers, in comparison to TCP surface. SEM imaging revealed that cells stretched multi-directionally to follow underlying 283-nm fibers, but extended along a single fiber axis on larger fibers. As the fiber diameter decreased, higher degree of proliferation and cell spreading and lower degree of cell aggregation were observed [80]. In the study [63], smaller aggregates were found on the nanosized scaffolds while most cells appeared to have migrated outward on the micron-sized scaffolds. This was attributed to a greater pore size and porosity of micron-sized scaffolds compared to nanosized scaffolds, which may allow better cell migration [63]. Lizarraga-Valderrama *et al.* [47] fabricated electrospun PHA fibers with diameters of 2.4 \pm 0.3, 3.7 \pm 0.3, and 13.5 \pm 2.3 μm and revealed a direct relationship between fiber diameter and neuronal growth and differentiation. The greatest number of neuronal cells was displayed on large fibers (13.5 \pm 2.33 μm) when grown individually and in co-culture with SCs. These fibers resemble α -fibres in diameter (12–22 μm), replicating the microtopography surrounding axon fibers inside the fascicles [47]. Thus comparative studies of

fiber size effect in nerve regeneration remain contradictory and incomplete and require further investigation.

1.1.7 Fiber alignment

For a nerve scaffold it is important to provide a unidirectional alignment of fibers. Neuronal differentiation entails a number of specific events, including formation and extension of neuritic processes [81], therefore it is critical to create an aligned fibrous template for cells to extend and elongate. Aligned topography is a versatile well-established and simple strategy to improve nerve regeneration process even without any additional biological and physico-chemical stimuli. After implanted into the nerve injury site, the fibers aligned in the longitudinal direction of the conduit wall are able to guide regenerating axons to connect the stumps of the nerve defect. Moreover, longitudinally aligned structures can mimic the myelinated axon white matter tracts in the central nervous system [82].

In a comprehensive study by Lins *et al.* [77] electrospun PVDF nerve scaffolds with varying degrees of fiber alignment were prepared by using the collector rotating speeds of 50, 100, 2000, or 3000 rpm. Nonaligned PVDF (50 rpm) was the most appropriate for sustaining NSCs survival and proliferation. Furthermore, nonaligned PVDF at 50 rpm favored both NSC maintenance and glial differentiation, while lowly aligned PVDF at 1000 rpm was the most appropriate for neuronal differentiation. SEM images of cells grown on the microfibrillar scaffolds revealed that the direction of neuronal cells elongation was parallel to the direction of fiber alignment for medium- and high-aligned fibers (2000 and 3000 rpm, respectively), whereas it was random for low-aligned and nonaligned fibers (1000 and 50 rpm, respectively).

In turn, Lee and Arinzeh [63] evaluated differentiation of human neural stem/progenitor cells (hNSCs/NPCs) on PVDF-TrFE nano- and microfibrillar scaffolds with either random or aligned structure. hNSCs/NPCs differentiated mostly into β -III tubulin-positive cells and had the greatest average neurite length on micron-sized, annealed, aligned scaffolds [63]. Neurites of dorsal root ganglion (DRG) extended radially on random PVDF-TrFE scaffolds, whereas aligned scaffolds directed neurite outgrowth for all fiber dimensions [73]. Similarly, SCs grown on aligned PHB/PHBV/collagen fibers exhibited a bipolar morphology orienting along the fiber direction, while SCs grown on the randomly oriented fibers had a multipolar morphology [65]. The study [37] demonstrated improved proliferation of rat neuronal-like cells (B65 cell line) on electrospun aligned PHB/chitosan scaffolds compared to random ones. Similar results were reported for adipose-derived stem cells grown on PHBV aligned nanofibers [48].

In an *in vivo* study [83] aligned nanofibrous conduits of P(VDF-TrFE) promoted extension of D β H⁺ axons and GFAP⁺ processes farther than random conduits. This study demonstrated SCs viability *in vitro* and survival of transplanted SCs and regeneration of axons within the conduits *in vivo* [83].

1.1.8 Surface wettability

Water wettability of a polymer surface (i.e. hydrophobicity vs. hydrophilicity) is known to be one key factor to influence cell–material interaction and the subsequent cell behaviors. Wettability of a surface can be largely affected by the surface functional groups [53, 85-88] and the surface roughness of the material [64, 89-96]. Normally, cells prefer a surface of moderate hydrophilicity for adhesion and growth, whereas polymer surfaces of superhydrophilicity (contact angle below 5°) and superhydrophobicity (contact angle above 150°) are not favorable to cells attachment and growth [97]. Suwantong *et al.* [64] compared PHAs electrospun microfibrinous scaffolds with PHAs solvent-cast films in terms of SCs attachment and proliferation *in vitro*. Surprisingly, SCs appeared to attach and proliferate much better on the flat smooth surfaces of the films than on the rough surfaces of the fibrous scaffolds. This result was attributed to a more hydrophilic surface of the films compared to the fibrous scaffolds.

Unfortunately, the majority of piezoelectric polymers, such as PVDF, PLLA, and PHAs are hydrophobic and their surface hydrophobicity inhibits sufficient cell adhesion [45, 97]. To solve this problem, plasma treatment [98] [84] [99], chemical hydrophilic functionization [1, 53, 55, 98] or polymer blending [35, 37, 40, 65] are routinely conducted for improving the hydrophilicity of polymeric scaffolds. For example, Xia *et al.* [45] proposed *in situ* hydrophilic modification on PLLA nanofibers for cell adhesion. Due to the electrostatic interaction between dopamine and PLLA nanofibers, the efficient and robust *in situ* modification is obtained without compromising the nanofibrous structure. Furthermore, the addition of chitosan decreased WCAs of PHB from 125° to 43° for random and from 111° to 33° for aligned PHB/CTS 80:20 scaffolds [35, 37]. Interestingly, high fiber alignment was reported to increase the hydrophilicity of electrospun scaffolds [35, 37].

1.2 Piezoelectric substrates for nerve tissue engineering

Conventionally, electrical signals are applied through conductive scaffold and external power in an invasive manner [105]. Electrical stimulation generally requires the use of auxiliary devices, such as electrodes to generate EFs. However, there are several drawbacks, associated with this approach, such as the need of a complex circuit system with external power source to provide electrical stimulation [19, 20], inflammation and gliosis caused by implanted electrodes [21], and finally the necessity of a second surgery to remove the electrodes. Moreover, the energy storage capacities of batteries are limited, which challenges the long-term use of such neurostimulators [22]. Therefore, wireless and self-powering devices for nerve defects repairing are still gaining an elevating interest. Unlike conventional electrical treatment, the use of piezoelectric polymers can provoke changes in surface charge without external energy sources or electrodes [23-26].

Piezoelectric polymers can convert mechanical force into electricity and vice versa. Piezoelectricity in polymers is the result of reorienting the molecular dipoles within the bulk polymer, which can be achieved through the application of a high EF or stretching (drawing) [30].

A significant piezoelectric response *via* bulk deformation may provide the stimulatory cues necessary to promote nerve tissue regeneration. *In vivo* the piezoelectric capacity of such materials can be activated by macro scale body movements [23], changes in posture or interstitial fluid circulation, which may help promote injury healing. In addition, the location of the piezoelectric implant in the body can affect the biological response due to the extent of anatomical deformation caused by random animal movements [111]. *In vitro* the desired deformations can be caused by the cell attachment and migration (the so called cell traction forces) [45, 73, 84, 112] and the general locomotion of tissue, as cells have been shown to contract the substrates by 1 to 3 μm [73]. Typically, the cell traction force is in the range of 0.1–10 nN [84, 112]. Zhang *et al.* [112] simulated the piezoelectric potential generated from cell motion on PVDF nanostriped arrays by applying a force of 0.1–10 nN at the top of the piezoelectric strip. As a result, the PVDF nanostripe generated piezoelectric potential from 34 μV to 3.4 mV as cell traction forces increased from 0.1 to 10 nN (Figure A.1, A–B). Liu *et al.* [84] directly observed the cell traction-driven deformation of piezoelectric nanofibers under a fluorescence microscope. From the time-lapse confocal imaging, there was obvious cells migration and nanofibers displacement, indicating that the PVDF nanofibers were deformed by 5 to 60 μm within 108 min [84] (Figure A.1, D–E). Although piezoelectric materials activated by cells and body movements have shown positive outcomes [23, 45, 73, 84, 111, 112], the stimuli controllability of these stimulators is rather weak. Electrical parameters offered by these self-powered scaffolds, such as current density, pulse width, stimulation frequency, and operation timeliness, cannot be well controlled by demands [22]. To

address this limitation, piezoelectric effect can be artificially promoted by alternative techniques such as noninvasive ultrasound [22, 58, 113] or magnetic fields [102].

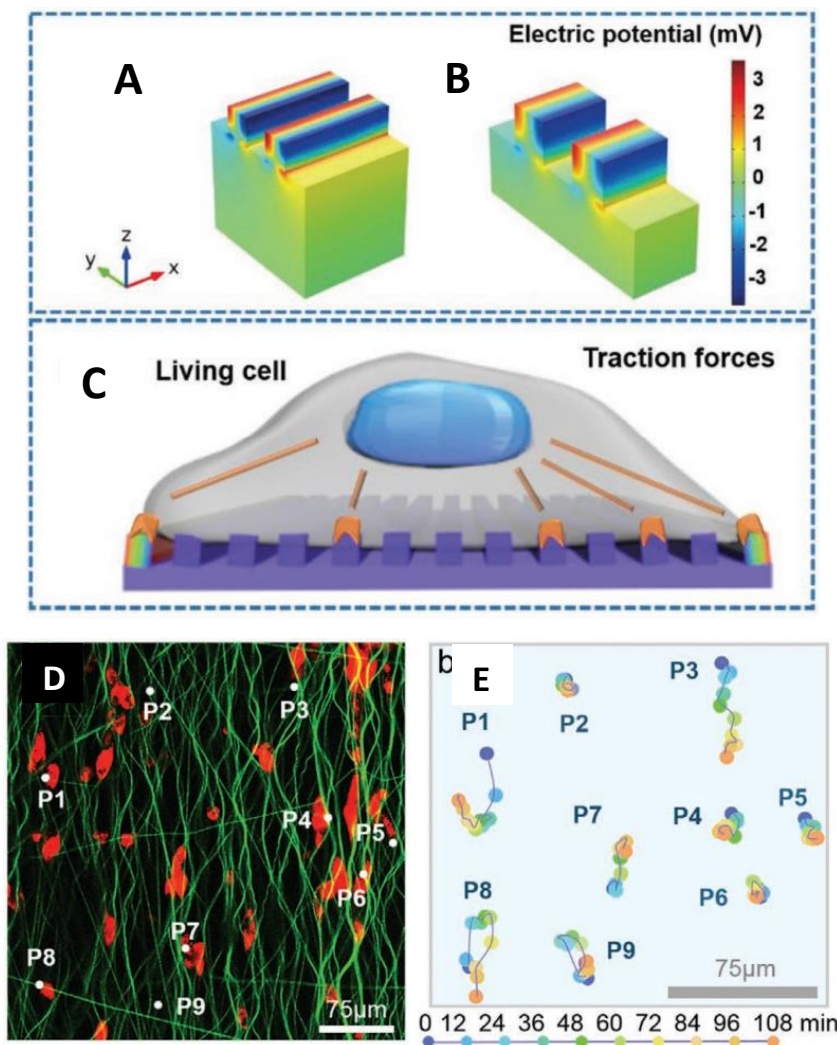


Figure A.1 – Cell-traction forces can induce PVDF mechanical deformation and, consequently, the piezoelectric potential. (A) The PVDF-200 nanostripe generated a maximum positive voltage of 3.4 mV when strained by a tangential force of 10 nN, while F_s 2.93 mV was generated by the PVDF-500 (D).

(C) Inherent cell forces of living cells grown on the surface of PVDF with nanoscaled stripe arrays. Reprinted with permission from [112]. (D) Fluorescence image of the PVDF nanofibers (green, FITC) and cells (red, DiD Perchlorate) after 24 h culture. (E) Migration paths of 9 random points of nanofibers within 108 min. Reprinted with permission from [84]

In previous studies, piezoelectric scaffolds were shown to support the adhesion, growth, differentiation, and myelination of SCs, as well as neurite extension [25, 52, 56, 76]. Piezoelectric composite scaffolds promoted proliferation and differentiation of PC12 cells [10, 57, 114]. Moreover, piezoelectric PVDF scaffolds could specifically enhance neuron-like differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs), as indicated by the expression of neural and neurogliaocyte

makers and Tuj1, as well as the neurite length [58, 84, 112]. Furthermore, US-mediated piezopolymer/ceramic composite films were shown to improve the viability and differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells by promoting Ca^{2+} transients [115]. As for *in vivo* studies, piezoelectric guidance channels were successfully used to repair transected sciatic nerves in adult mice and rats and significantly promoted axons myelination, as well as electrophysiological, morphological and functional nerve restoration, comparable to the current gold standard [25, 62, 116]. This was attributed to fields or charges generated by the piezoelectric conduits [116]. Furthermore, electroactive conduits were shown to support SCs survival, regeneration of sensory (CGRP⁺) and brainstem (D β H⁺), extension of astrocyte/GFAP⁺ processes, and blood vessel formation after complete spinal cord transection [83].

The mechanism by which piezoelectric scaffolds promote nerve tissue regeneration is rather complex and may involve multiple aspects. In fact, many extracellular and cytoplasmic biopolymers, including ubiquitous polypeptides (*e.g.* collagen and many enzymes) and polynucleotides (*e.g.* RNA and DNA), exhibit piezoelectric or charge storage capabilities [8, 116]. These properties play important roles in tissue growth and remodeling by intersecting electrical, mechanical, and chemical activities. It is possible that the primary purpose for piezoelectricity associated with these biopolymers is to alter their conformation or orientation through an electro conformational coupling mechanisms, and thereby enhance enzyme-driven reactions [117]. It is also possible that the piezoelectric capacity of biopolymers is responsible for increasing synthesis or secretion of ECM molecules [118], which may administer neurite outgrowth. Moreover, the growth cone at the leading edge of the neurite may serve as an EF sensor which transmits growth signals to the nucleus *via* second messenger systems [119]. Electroactivity of piezoelectric polymers may complement the distinct electrical environment characterizing the nervous system. Furthermore, electrical stimulation by polymeric substrates can result in the adsorption of positive charges and ECM molecules onto the polymeric chains [120], which also boosts neural regeneration. It was also proposed that the piezoelectric effect may (1) facilitate the migration, proliferation and differentiation of SCs; (2) promote the secretion of nerve growth factors (NGFs) by SCs; (3) have a chemotactic effect on tubulin and microfilaments in axons [25]. At the same time, electric potential generated by piezoelectric scaffolds were shown to enhance angiogenesis, which further contributes to nerve restoration [25].

Recently the underlying molecular mechanism of the neuron-like PC12 cells differentiation by piezoelectric stimulation has been investigated [113], wherein the electrical polarization of the PVDF membrane induces a repolarization of the cell membrane, resulting in an enhanced influx of Ca^{2+} ; subsequently, downstream mechanisms cause the activation of the cAMP/PKA pathway,

which leads to the induced differentiation potential of PC12 cells (Figure A.2). In turn, Zhang *et al.* [58] studied ultrasound-mediated neural differentiation of stem cells on FeOOH/PVDF membranes and speculated that the local electrical signals, generated by the membranes, might be transmitted to the intracellular environment through direct contact between the material and cells. These signal stimulations could promote the expression of related genes, which in turn induce neural differentiation of stem cells.

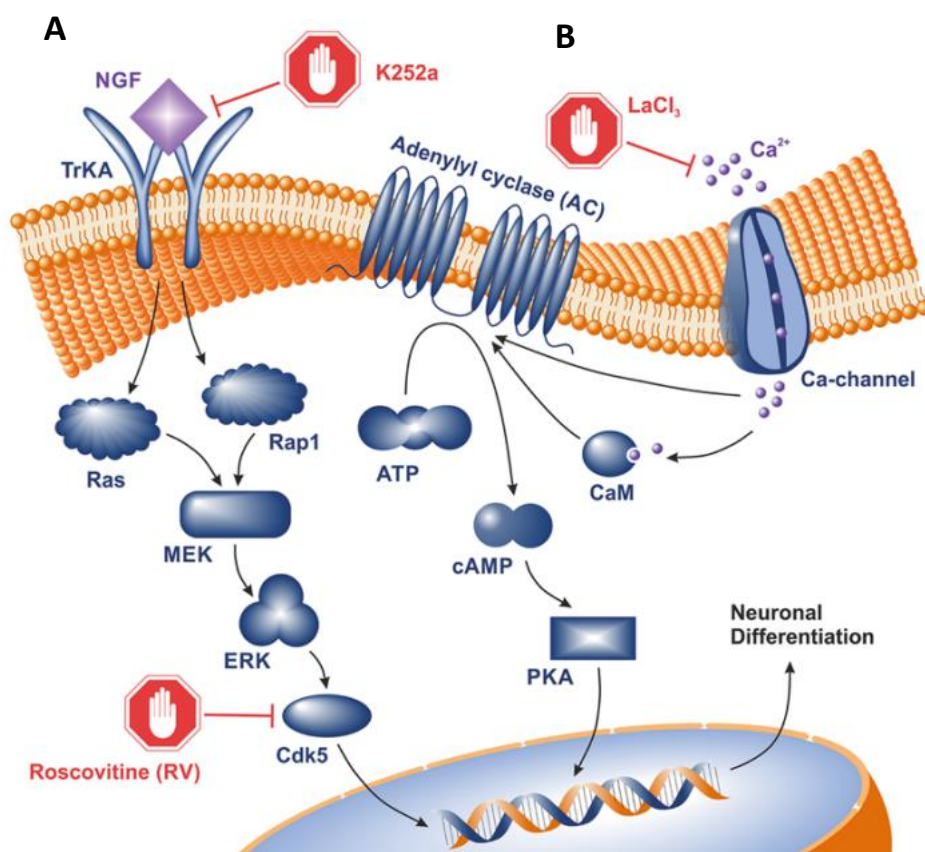


Figure A.2 – Illustration of intracellular pathways affecting PC12 differentiation. (A) The well-studied NGF-induced differentiation *via* TrKA/Ras/MEK/ERK pathway. (B) The differentiation pathway induced by piezoelectric depolarization of the PC12 cell membrane, *i.e.* the cAMP-dependent pathway. Reprinted with permission from [113]

As has been previously mentioned, creating a well-aligned structure is critical for guiding regenerating neural cells and tissues. In order to test the combination of electrospun fiber topography with electrical stimulation for neural regenerative applications, Koppes *et al.* [100] examined neurite outgrowth on either PLLA films or 2 μm electrospun fibers in the presence or absence of electrical stimulation (Figure A.3). The results indicated that neurite extension increased by 74% on the aligned fibers compared to the film controls (Fig. A3, A, C). Stimulation alone increased outgrowth by 32% on films relative to unstimulated film controls (Fig. A3, A, B). The combination of topographical and biophysical cues resulted in a synergistic 126% increase in

outgrowth relative to unstimulated film controls (Fig. A3, A, D). Thus topographical cues provided by the fibers were more dominant in supporting the extent and directionality of neurite outgrowth compared to electrical stimulation alone. Furthermore, recently it has been found that topography rather than piezoelectricity plays crucial role in cell adhesion and proliferation, while the piezoelectricity rather than the nanotopography could enhance neuron-like differentiation of rBMSC [112]. Thus coupling aligned topographical cues with electric stimuli can have a synergistic effect to boost all the cellular activities, from cell adhesion to differentiation.

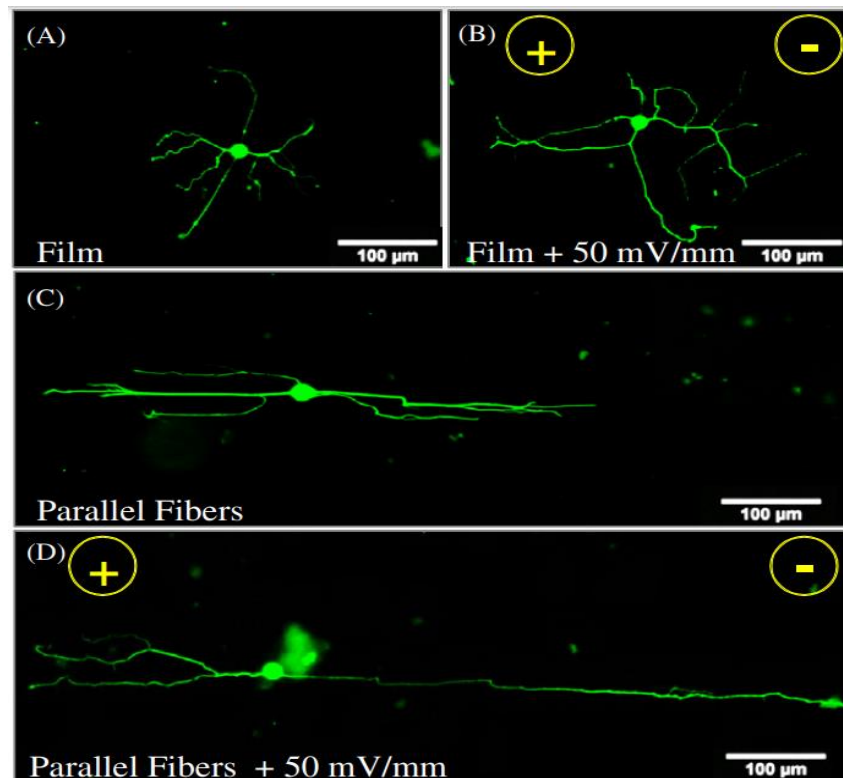


Figure A.3 – Electrical stimulation and topographical cues from aligned PLLA fibers serve to promote neurite outgrowth. Immunofluorescent images of neurons on laminin-coated PLLA films and electrospun fibers with or without electrical stimulation are shown. Neurite outgrowth on the unstimulated, control PLLA films (A) was shorter than outgrowth emanating from electrically stimulated neurons (50 mV/mm; 8 h) (B). Neurite outgrowth was greater on the aligned fibers (C) in comparison to planar films (A). Combining electrospun fibers with electrical stimulation further enhanced neurite outgrowth (D) relative to either the aligned fibers (C) or electrical stimulation alone (B). Green = β -III-tubulin neurons, direction of the electric field is shown (\pm).

1.3 Polyhydroxyalkanoates for nerve tissue engineering

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are promising materials for nerve tissue engineering due to their natural origin, slow resorption rate without toxic degradation products and mechanical stability [37, 47, 54, 55]. In addition, PHAs are known to exhibit neuroregenerative properties [47]. The relatively slow degradation rate of PHAs in the organism, compared to commonly used PLLA, PGA or their co-polymers PLGAs, is highly consistent with the slow regeneration of the nerve tissue [1, 61]. The most commercially available, well-studied and commonly used PHB is intrinsically brittle and exhibits inadequate mechanical properties to meet the requirements of NGCs [64, 65]. To overcome the brittleness, PHB is frequently blended with other polymers (PCL, chitosan, other PHAs, *etc.*) [1, 35, 37, 47] or co-polymers are used instead, such as P(3HB-co-4HB) [1], poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) [55, 61] or PHBV [40, 48, 53, 64, 65]. For example, the addition of PCL was shown to improve the bending and tensile properties of PHB [1]. Several authors [64, 65] confirmed that electrospun PHBV fiber mats were more flexible than electrospun PHB counterparts. Bian *et al.* [61] investigated the PHBHHx co-polymer for possible application in repairing damaged nerves. Porous nerve conduits with both uniform and non-uniform wall porosities were prepared using a particle leaching method and employed to bridge the 10 mm defects in the rat sciatic nerves. Mechanical tests showed that the PHBHHx nerve conduits had proper mechanical properties with maximal stresses of 2.3 MPa and 0.94 MPa for the conduits with non-uniform and uniform wall porosities, respectively. Compound Muscle Action Potentials (CMAPs) were clearly observed in both types of the PHBHHx nerve conduits after 1 month of implantation, indicating a rapid functional recovery for the disrupted nerves. Histological sections demonstrated the ability of non-uniform conduits to prevent the connective tissues from ingrowth penetration. After implantation for 3 months in the rats, the PHBHHx lost 20–24% of their original weight.

Hinüber *et al.* [1] developed a hierarchically structured NGC consisting of a permeable tubular shell and melt-spun fibrillar lumen fillers. The permeable tubes were constructed from either PHB/PCL blend or P(3HB-co-4HB). Polyvinylpyrrolidone was used as a porogen in solvent-free thermoplastic processing, followed by selective polymer leaching. Mechanical properties of all conduits compositions were evaluated as a function of hydrolytic degradation time. The gradual decrease in both ultimate load and elongation was detected during 16 week degradation. PHB/PCL blends were more stable than P(3HB-co-4HB) blends. Since P(3HB-co-4HB) degraded faster, it should be considered for shorter term regenerative applications. The porous scaffolds allowed diffusion of large molecules of 70 kDa. Permeation of 50% of the molecules took less than 10 h for a wall thickness of 250 μm , which is sufficient for effective

diffusion of essential nutrients and metabolites through the conduit wall. *In vitro* studies demonstrated that mouse fibroblasts survived and proliferated inside the porous tubes. An *in vitro* model of axonal regeneration using DRG and sympathetic cervical ganglia demonstrated that the NGCs supported neuron survival and neurite outgrowth. The further introduction of fibrillar lumen fillers promoted oriented neurite growth and coating with ECM proteins further increased ganglia attachment and cell migration.

The hydrophobicity of PHB is another shortcoming limiting its biomedical applications; hence it is not desirable to use it alone for the fabrication of tissue engineering scaffolds. Alloying of PHB with natural polymers emerged as an efficient approach to render PHB hydrophilic [35, 37, 40, 65]. As such, chitosan (CTS) is a natural polymer usually derived from the cell wall of fungi and microorganisms, known for its biocompatibility and nonmalignant degradation products [15, 35, 37]. The inherent physicochemical properties of CTS like biodegradability and biocompatibility, good cell adhesion, hydrophilicity and non-toxicity have prompted its use in tissue engineering. With this in mind, Tar *et al.* [35, 37] introduced PHB/CTS electrospun aligned and random fibrous scaffolds for nerve tissue engineering applications. Average diameters for aligned PHB, PHB/CTS 85:15 and PHB/CTS 80:20 were obtained as 675 nm, 740 nm, and 870 nm, respectively, which was less than random fibers. The addition of 15 and 20 wt. % CTS to PHB caused noticeable enhancement in surface porosity percentage of fibrous scaffolds. As intended, the addition of CTS decreased WCAs from 125° to 43° for random and from 111° to 33° for aligned PHB/CTS 80:20 scaffolds. Importantly, high fiber alignment caused tremendous increase in hydrophilicity of PHB-based scaffolds. Tensile strength increased from 6.41 MPa for random to 8.73 MPa for aligned PHB/CTS 85:15 scaffolds. Aligned PHB, PHB/CTS 85:15, and PHB/CTS 80:20 lost approximately 20%, 25%, and 35%, respectively, after 8 weeks of degradation in PBS. Thus, biodegradation rate of the scaffolds was increased by enhancement of CTS percentage due to the great biodegradability of CTS. Finally, results of MTT assay demonstrated improved proliferation of rat neuronal-like cells (B65 cell line) on electrospun aligned PHB/CTS scaffolds compared to random ones. SEM indicated that the bi-polar neurite extensions and the orientation of nerve cells were aligned in the direction of the fiber alignment.

Collagen is the major element of native ECM, which induces minor immune response; hence it is a suitable substrate for cell adhesion. Masaeli *et al.* [65] fabricated electrospun scaffolds by blending PHB and PHBV with addition of type I collagen in order to investigate their potential for the regeneration of the myelinic membrane. DSC indicated that the melting and glass temperatures, as well as crystallization degree of the nanofibrous blends decreased as the PHBV weight ratio increased. Moreover, blending of PHB with PHBV improved both tensile strength

and elongation of the PHB/PHBV scaffolds, compared to the neat PHB. SCs attached and proliferated over all scaffolds up to 14 days regardless fiber alignment or formulation. Notably, SCs grown on aligned PHB/PHBV/collagen fibers exhibited a bipolar morphology orienting along the fiber direction, while SCs grown on the randomly oriented fibers had a multipolar morphology. Incorporation of collagen within nanofibers increased SCs proliferation on day 14, GDNF gene expression on day 7 and NGF secretion on day 6. Thus the presence of type I collagen in the nanofibers improved cell differentiation. Further study of this group was focused on surface functionalization of electrospun aligned PHB/PHBV nerve scaffolds with synthetically produced peptides [53]. SCs orientated along the fibers, matching the cell morphology found in native tissues. Although immunostaining analysis showed that SCs could adhere, migrate, and form elongated cellular processes on both untreated and biofunctionalized PHAs scaffolds, a higher degree of spreading were found, when PHB/PHBV nanofibers were functionalized with biomolecules. Furthermore, biofunctionalization of PHB/PHBV scaffolds increased metabolic activity and proliferation of SCs compared to unmodified scaffold. Other studies report improved biological performance of PHA electrospun scaffolds after the addition of collagen [40, 98].

Xie *et al.* [55] showed that surface coating of PHBHHx, PHBVHHx, and PLLA films by the fusion proteins can promote the adhesion, proliferation and neural differentiation of rat NSCs. Among the tested samples, PHBVHHx coated with PhaP–IKVAV yielded the highest levels in cell adhesion and proliferation, while the PLLA film coated with PhaP–IKVAV promoted better neural differentiation and neurite outgrowth in the early stage. Because these proteins can be produced in an inexpensive manner, PhaP–IKVAV appeared an ideal nonspecific coating agent to functionalize hydrophobic biomaterials in the application of neural TE.

Regeneration with use of NGCs can be enhanced by manipulation of the local microenvironment through the addition of growth factors [54, 142]. Glial growth factor (GGF) is a trophic factor specific for SCs which are essential for axonal regrowth following injury. Mohanna *et al.* [54] used composite PHB conduit containing GGF to bridge 2–4 cm nerve gaps in the rabbit peroneal nerve. PHB-GGF significantly increased nerve regeneration up to 63 days following repair of long nerve gaps and the regeneration was sustained long term leading to motor organ reinnervation. At 120 days postoperatively, GGF addition significantly increased the quantity of SCs and axonal regeneration compared to those in control conduits. Furthermore, PHB-GGF contained more minifascicles of myelinated fibers compared to the controls. Finally, PHB-GGF conduits significantly reduced the muscle mass percentage loss compared to controls.

Novikova *et. al* [137] combined a PHB tubular conduit with aligned fiber orientation and SCs in order to evaluate axonal regeneration after cervical spinal cord injury in adult rats. The

pristine PHB conduit could support attachment and proliferation of adult SCs. However, addition of the ECM molecules, such as fibronectin, laminin and collagen significantly improved cell survival. *In vivo* results demonstrated that the PHB-based conduit loaded with SCs supported marked axonal regeneration within the graft. Similarly, Armstrong *et al.* [143] reported that coating PHB-based conduits with ECM molecules enhanced SCs proliferation in the row laminin > fibronectin > collagen. ECM proteins, especially laminin, are important for regrowth of sensory neurons by promoting attachment, migration and neurite outgrowth [1]. The laminin- and collagen-coated fibers may resemble the endoneurium, which is mainly composed of different extracellular proteins and gives support to the Schwann and neuronal cells [1].

As has been discussed, loading NGCs with viable SCs is a well-established strategy to enhance their biological performance *in vitro* and *in vivo* [36, 52, 83, 137, 144, 145]. However, the clinical use of endogenous SCs is limited, as nerve injuries require prompt surgical management and adequate numbers of cells cannot be harvested quickly as required. To overcome this obstacle, various types of stem cells that can differentiate into neurons have been investigated [15, 48, 49]. Hu *et al.* [48] integrated an aligned nanofibrous (~635 nm) PHBV conduit with neuronally differentiated adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) to bridge 10 mm transected rat sciatic nerves *in vivo*. Proliferation rates of ASCs on the nanofibrous scaffolds validated the good biocompatibility of PHBV and these cells. Meanwhile, aligned fibers more favored ASCs adhesion, survival and proliferation compared with randomly oriented ones. Immunohistochemically, staining and motor function restoration assay demonstrated that this approach facilitated nerve regeneration, neurogenesis and recovery of motor function with SFI value of -34.7 ± 1.2 at week 10 post-operation. In turn, Ozer *et al.* [15] assessed the efficacy of seeding chitosan-coated PHB conduits with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSC-bm) in repairing 10 mm sciatic nerve injuries. The results were evaluated 8 weeks postoperatively by observation, electromyography, and histologic examination. Histologic examination showed that both PHB/chitosan-hMSC-bm and PHB/chitosan conduits supported axon regeneration. When the effects were compared, the regenerative capacity of the PHB/chitosan-hMSC-bm conduits was superior to that of the PHB/chitosan conduits but not as efficient as the autologous nerve grafts.

Many other studies demonstrate positive outcomes of PHB-based NGCs using various *in vivo* models [145-148]. Among them the rabbit peroneal nerve defect [54, 142, 148] is of a great interest, since conduits must support regeneration of large gaps of over 2 cm to be accepted into general clinical practice. Young *et al.* [148] investigated the potential of PHB conduits to bridge nerve gaps (up to 4 cm) in a rabbit common-peroneal-nerve injury model. Immunostaining

revealed that at day 42 post-implantation, the area of regenerating nerve fibers in the PHB group was greater than that in the nerve autograft group, indicating that PHB conduits were capable of long-gap PNI repair.

Table A.1 – Summary of the PHA-based scaffolds and conduits for nerve tissue engineering

Scaffold (conduit) composition	Fabrication technique	Scaffold (conduit) characterization	Biological model	Key outcomes	Ref.
PHB vs. PHBV	Electrospinning vs. solvent-casting	The diameters of the PHB and PHBV fibers were 3.7 ± 1.7 and 2.3 ± 2.1 μm , respectively. PHBV fiber mats were more flexible than the PHB counterparts. The mechanical integrity of the cast films was much better than that of the fiber mats.	SCs	Both types of materials were biocompatible; SCs proliferated on the smooth cast films better than on the rough fibrous scaffolds.	[64]
PHB/PCL or P(3HB-co-4HB) shell; PHB core	Microextrusion and leaching (shell); melt spinning (core)	The shell thickness was 250 or 500 μm . The core fiber diameter was 20 μm . The optimal shell porosity and pore size were 55% and 0.5 μm , respectively. PHB/PCL shell was more mechanically stable and elastic with mean initial ultimate load and elongation of over 5 N and 80%, respectively. Permeation of 50% of the large molecules took less than 10 h for a wall thickness of 250 μm .	DRG; sympathetic cervical ganglia (SCG)	The NGCs supported neuron survival and neurite outgrowth. Introduction of fibrillary lumen fillers promoted oriented neurite growth and coating with ECM proteins further increased ganglia attachment and cell migration.	[1]
PHB/PHO 25:75	Electrospinning	Aligned fibers of varied diameters: 2.4 ± 0.3 , 3.7 ± 0.3 , and 13.5 ± 2.3 μm .	NG108-15 neuronal cells	Aligned fibrous scaffolds facilitated the cell growth, proliferation, and differentiation, which were much higher than those on the cast film. The scaffold with large fiber diameter (13.50 ± 2.33 μm) was the best for neurite	[47]

				outgrowth and differentiation.	
PHB/CTS 15 to 20 wt. %	Electrospinning	Average diameters for aligned scaffolds were 740–870 nm, which were lesser than for random fibers. The addition of CTS (20 wt. %) decreased WCAs from 111° to 33° for aligned scaffolds. Tensile strength increased from 6.41 MPa for random to 8.73 MPa for aligned PHB/CTS 85:15 scaffolds. PHB/CTS lost 25 to 35% of mass after 8-weeks degradation <i>in vitro</i> .	B65 cells	Improved cell proliferation; bipolar neurite extensions and the orientation of nerve cells in the direction of the fiber alignment.	[35, 37]
PHB/PHBV/collagen 45:45:10	Electrospinning	Fiber diameters of aligned (5000 rpm) and random (1000 rpm) fibers were 963±117 and 925±156 nm, respectively. The flexibility of aligned scaffolds was improved. WCA of PHB/PHBV/collagen was 95±9°.	SCs	The scaffolds supported SCs adhesion and proliferation up to 14 days. SCs had a bipolar morphology orienting along the fiber direction. Incorporation of collagen improved cell proliferation and differentiation.	[65]
Peptide-modified PHB/PHBV 50:50	Electrospinning	Aligned fibers of 925±156 nm. WCA was 107.4±5.0° for the untreated PHB/PHBV scaffold and reached 0° after the modifications.	SCs	SCs could adhere, migrate, and elongate on both untreated and modified scaffolds; a higher degree of spreading was found for the functionalized scaffolds. Functionalization of scaffolds increased cells metabolic activity and proliferation.	[31]
PHBV/collagen 50:50	Electrospinning	Aligned fibers of 229 ± 65 nm. Mechanical properties were investigated depending on the fiber alignment and collagen content. Tensile strength, elongation, and Young's modulus of aligned	PC12 cells	A 40% enhanced cell proliferation on aligned PHBV/collagen nanofibers compared with neat PHBV. PHBV/collagen	[40]

		PHBV/collagen 50:50 were 6.3±0.4 MPa, 13±3%, and 193±3 MPa, respectively.		supported cell differentiation.	
Collagen-cross-linked PHB	Electrospinning	The diameters of 600 and 900 nm and the WCAs of 135° and 52° were obtained for the unmodified and collagen-cross-linked mats, respectively.	SCs	Enhanced cell adhesion.	[98]
PHBHHx, PHBVHHx or PLLA, coated by fusion proteins	Solvent-casting	PHA films had interconnected porous structures and grainy surface characteristics. WCA of the PHBVHHx film decreased from ~100° to ~75° after coating with proteins.	Rat NSCs	PHBVHHx coated with PhaP-IKVAV yielded the highest cell adhesion and proliferation, while the PLLA/PhaP-IKVAV film promoted better neural differentiation and neurite outgrowth.	[55]
PHBHHx	Particle leaching	Maximal stresses were 2.3 MPa and 0.94 MPa for the conduits with non-uniform and uniform porosities, respectively. PHBHHx lost 20–24% of mass after 3 months <i>in vivo</i> .	10-mm rat sciatic nerve defect (1 month)	Rapid functional recovery of nerves, evidenced by CMAPs in PHBHHx conduits.	[61]
PHB, modified by ECM molecules and SCs	Not described.	Unidirectional fiber orientation.	Rat cervical spinal cord injury	PHB conduit supported attachment and proliferation of SCs. The addition of ECM molecules (fibronectin, laminin, and collagen) improved cell survival. SCs-filled PHB conduit supported marked axonal regeneration within the graft.	[137]
ASCs-filled PHBV	Electrospinning	Aligned fibers of 635 nm.	10-mm rat sciatic nerve defect (10 weeks).	Improved ASCs adhesion, survival, and proliferation on aligned fibers compared with random ones. Facilitated nerve regeneration, neurogenesis and motor	[48]

				function recovery with SFI of -34.7 ± 1.2 .	
PHB/CTS, loaded with hMSC-bm	Electrospinning	Aligned fibers of 600 nm. The tensile strength, elongation at break, and Young's modulus were 3.8 ± 0.3 MPa, $4.2 \pm 0.7\%$, and 116 ± 11 MPa.	10-mm rat sciatic nerve defect (8 weeks).	The regenerative capacity of the PHB/CTS–hMSC-bm conduits was superior to that of the PHB/CTS but not as efficient as the autograft.	[15]
PHB	The conduits were formed from PHB sheets	The fibers orientation was along the conduit longitudinal axis. The conduit internal diameter was 1.6 mm.	10-mm rat sciatic nerve defect (1 month)	Good axonal regeneration with negligible inflammatory infiltration. Good angiogenesis was present at the nerve ends and through the walls of the conduit.	[147]
PHB, filled with alginate, fibronectin, and SCs	Commercial PHB conduits were loaded with alginate matrix with addition of fibronectin and SCs	Not conducted.	10-mm rat sciatic nerve defect (6 weeks)	The addition of fibronectin and SCs to the conduits had a synergistic effect to enhance nerve regeneration.	[145]
PHB	The conduits were rolled from PHB sheets	Unidirectional fiber orientation along their long axes.	2–4-cm rabbit peroneal nerve gap (63 days)	By day 42, regenerating axons had completely bridged nerve gaps in groups with nerve autografts and in those with PHB conduits. The area of immunostained regenerating fibers in the PHB group was greater than that in the nerve autograft group.	[148]
PHB-GGF	NGCs were formed from PHB sheets.	NGCs consisted of compressed PHB fibers (2–20 μm in diameter), running in a parallel direction.	2–4-cm rabbit peroneal nerve gap (120 days)	PHB-GGF increased nerve regeneration up to 63 days, leading to motor organ innervation. GGF increased the quantity of SCs and axonal	[54, 142]

				regeneration. PHB-GGF contained more minifascicles of myelinated fibers compared to the controls. PHB-GGF reduced the muscle mass percentage loss compared to controls.	
--	--	--	--	---	--

The aforementioned studies have demonstrated the potential of various strategies to render nerve PHAs scaffolds bioactive, including polymers blending [1, 35, 37, 47]; addition of natural polymers [35, 37, 40, 65]; addition on growth factors [54, 142], seeding SCs or MSCs onto PHAs scaffolds [15, 48, 49, 137]; surface biofunctionalization with ECM molecules [98, 137, 143, 145], synthetically produced peptides [53] or proteins [55], and so on. Also, the crucial role of topographical cues of scaffolds with aligned structure for neural cells attachment, proliferation, and differentiation has been abundantly discussed [37, 40, 47, 48, 65].

1.4 Magnetoactive materials for nerve tissue engineering

Another strategy to promote the peripheral nerve restoration is the incorporation of magnetic nanoparticles (MNPs) into the polymeric matrix with subsequent applying of a magnetic field (MF). This approach allows stronger and more controlled forces on neurons at the cellular level, wherein MNPs magnetize in the external MF and generate mechanical tension on organelles and the cell membrane [5, 9, 14]. Magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles are commonly used as fillers in magnetoactive biomaterials due to high values of magnetization, biocompatibility, unique physiochemical properties and chemical stability under physiological conditions. Magnetic composite scaffolds have already been explored for neural regeneration [5, 9, 10, 14, 17]. For instance, Chen *et al.* [5] designed a multilayered composite PCL-based NGC, loaded with melatonin and Fe₃O₄ MNPs, which showed sufficient mechanical strength and biocompatibility *in vitro*, and evidently promoted morphological, functional, and electrophysiological recovery of regenerated sciatic nerves *in vivo*. Furthermore, Liu *et al.* [9] demonstrated the synergism of chitosan-based composite scaffold with MNPs and the applied MF to enhance the viability of SCs after transplantation.