

©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО СЛОЯ 3D-МАТРИКСОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

В.С. Черноносова^{1,2}, Р.И. Квон³, Е.В. Киселева⁴, А.О. Степанова^{1,2}, П.П. Лактионов^{1,2}*

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН,
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8; тел.: (383)363-51-44; факс: (383) 363-51-53;
эл. почта: vera_mal@niboch.nsc.ru

²Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр
имени академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск

³Институт катализа имени Г.К. Борескова Сибирского отделения РАН, Новосибирск

⁴Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск

Исследованы матриксы, изготовленные методом электроспиннинга из растворов поликапролактона с человеческим альбумином или желатином в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол. Микроструктура поверхности матриксов была исследована с помощью сканирующей электронной микроскопии, распределение белка в поверхностном слое – модификацией N-(2-гидроксиэтил)феназином и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопией. Показано, что концентрация белка в поверхностном слое волокна может до 12 раз превышать таковую в исходном растворе, причем, чем ниже концентрация белка в растворе, тем выше его относительное содержание на поверхности волокон. При инкубации матриксов в водных растворах концентрация белка в поверхностном слое уменьшается (не более чем на 10%) в течение первых 30-60 мин и сохраняется на этом уровне длительное время (7 суток). Обработка протеиназой К уменьшает концентрацию белка в поверхностном слое в среднем на треть. Таким образом, оба использованных в работе метода могут быть применены для исследования поверхностного слоя материалов, изготовленных методом электроспиннинга из смесей синтетических и природных полимеров, однако рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия представляет собой более удобный и информативный способ.

Ключевые слова: 3D-матриксы, синтетические и природные полимеры, электроспиннинг, рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия, химическая модификация

DOI 10.18097/PBMC20176301032

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время объёмные (3D) матриксы, изготовленные методом электроспиннинга, широко используются в качестве материалов для тканевой инженерии [1]. Этот метод позволяет получать 3D-матриксы, состоящие из волокон диаметром от 20 нм до нескольких микрон из растворов синтетических или природных полимеров, их смесей, вводить в состав матриксов лекарственные препараты, факторы роста и т.д. [2, 3]. Волокнистая структура матриксов обеспечивает благоприятные условия для их клеточного заселения и интеграции с окружающими тканями [1, 4, 5]. Кроме того, варьируя укладку волокон в составе одного матрикса, можно формировать слои разного состава, управлять физическими и химическими свойствами получаемых материалов [6]. Поверхность 3D-матриксов, предназначенных для формирования тканеинженерных конструкций, в первую очередь определяет взаимодействие клеток с матриксами [5, 7], интеграцию материала с окружающими тканями [4-6], иммунную реакцию [8], гемосовместимость [5] и т.д. и, поэтому, имеет принципиальное значение для воссоздания функциональных свойств замещаемых участков повреждённых тканей.

Ранее было показано, что модификация поверхности 3D-матриксов белками (желатин, ламинин) повышает адгезию и пролиферацию клеток на таких матриксах [9, 10], в то время как модификация гепарином, напротив, уменьшает

адгезию тромбоцитов [11, 12]. В литературе описано несколько вариантов модификации поверхности матриксов, изготовленных методом электроспиннинга: 1) введение в состав полимера реакционноспособных групп с последующим формированием ковалентных связей с различными белками и полисахаридами [13, 14]; 2) активация поверхности физическими методами (плазма, лазер и УФ-облучение) с последующим ковалентным присоединением биомолекул [14, 15]; 3) физическая сорбция белков на поверхности матриксов [16, 17]. Следует отметить, что в состав раствора основного полимера могут быть введены различные биополимеры. Такой подход часто используется для увеличения прочности и биосовместимости материалов для тканевой инженерии [5, 18, 19]. Действительно, в экспериментах с культурами клеток было обнаружено, что такие матриксы быстрее заселяются клетками [20]. Однако, количественные данные о строении поверхностного слоя волокнистых материалов, полученных методом электроспиннинга из смесей полимеров, отсутствуют.

Целью работы являлось исследование экспонирования белков в поверхностном слое 3D-матриксов, изготовленных методом электроспиннинга из растворов, содержащих смесь синтетического полимера и белка. Количество белка, экспонированного в поверхностном слое матриксов, определяли при помощи рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) и химической модификации N-(2-гидроксиэтил)феназином (Фен).

* - адресат для переписки

МЕТОДИКА

Получение 3D-матриксом методом электроспиннинга

Растворы для получения матриксом методом электроспиннинга готовили из маточных растворов полимеров в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол, в качестве которых были использованы: 10% раствор поликапролактона (ПКЛ), 5% раствор человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и 5% раствор желатина (Жл). Концентрация белков в матриксах приведена как % от ПКЛ (вес : вес). Все 3D-матриксом были получены на установке для электроспиннинга NF-103 ("МЕСС", Япония). Матриксом размером 35×45×0,18 мм изготавливали при скорости подачи раствора 1-1,3 мл/ч, напряжении 21,7-25 кВ, скорости вращения барабана-коллектора 300 об/мин, расстоянии между барабаном-коллектором и фильерой 19 см. Материалы, полученные методом электроспиннинга, инкубировали под вакуумом (ост. давление 10⁻² торр) при комнатной температуре не менее 2-х ч для удаления остатков растворителя.

Исследование микроструктуры поверхности 3D-матриксом

Микроструктуру поверхности 3D-матриксом исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Для этого матриксом фиксировали при помощи электропроводящего скотча, затем на образцы напыляли 10 нм слой золота для увеличения до 3000 и исследовали матриксом с использованием микроскопа JSM-6460 LV ("Jeol", Япония). Для более высокого разрешения (×50000) на образцы напыляли 1,5-2 нм хрома и исследовали с использованием сканирующего электронного микроскопа СВН МА 10 ("Carl Zeiss", Германия).

Модификация матриксом N-(2-гидроксиэтил)феназином

Концентрацию аминокрупп на поверхности волокон определяли с помощью модификации Фен по ранее описанной методике [21].

Из плоских 3D-матриксом, содержащих ПКЛ, ПКЛ с белком в различных концентрациях, были вырезаны диски диаметром 10 мм и весом приблизительно 5,5 мг. Эти диски помещали в 48-луночный планшет и инкубировали в 10 mM фосфатном буфере, содержащем 0,15 M NaCl, pH 7,5 ("Sigma", США) в течение 16 ч для эффективного смачивания материала и удаления белка, слабо связанного с поверхностью матриксом. Затем матриксом дважды ополаскивали H₂O и инкубировали в течение 45 мин с 0,3 мл свежеприготовленного раствора Фен (0,3 мг/мл) в 0,2 M Na₂CO₃ с 20% C₂H₅OH. Для удаления избытка несвязанного Фен диски дважды отмывали буфером, содержащим 0,2 M Na₂CO₃ с 20% C₂H₅OH, трижды отмывали фосфатным буфером по 30 мин, дважды H₂O в течение 15 мин, а затем 50% раствором C₂H₅OH в течение 30 мин с последующей промывкой дисков H₂O. Диски высушивали на воздухе, взвешивали и растворяли в 0,3 мл 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанола

для последующего измерения оптической плотности при λ=521 нм с использованием спектрометра Genesys 10 UV ("Thermo Scientific", США). Концентрацию аминокрупп белка в диске рассчитывали с использованием молярного коэффициента поглощения при 521 нм = 15849 M⁻¹cm⁻¹.

Ферментативная обработка матриксом

Для гидролиза экспонированного на поверхности матриксом белка была использована протеиназа К ("Sigma") с удельной активностью 60 ед/мг фермента. Для определения концентрации белка, оставшегося на поверхности матриксом после ферментативного гидролиза, использовали химическую модификацию или РФЭС. Для этого диски диаметром 10 мм, содержащие различные концентрации биополимеров, инкубировали с фосфатным буфером ("Sigma"), как описано выше, а затем с 0,3 мл раствора протеиназы К с концентрацией 0,2 мг/мл при 40°C в течение 2 ч. После инкубации диски тщательно отмывали тремя сменами фосфатного буфера, затем трижды дистиллированной H₂O и озвучивали в ультразвуковой бане для удаления неспецифически связанного белка, как описано в [22], и определяли концентрацию белка на поверхности матриксом.

Определение количества белка в поверхностном слое 3D-матриксом с помощью РФЭС

Исследование матриксом методом РФЭС проводили на электронном спектрометре производства компании "SPECS" (Германия), оснащённом полусферическим анализатором PHI1050-150 с девятиканальным детектором и монохроматизированным источником MgKα излучения. Обзорные спектры записывались при энергии пропускания анализатора 50 эВ, спектры высокого разрешения – при 10 эВ. Предварительно спектрометр был откалиброван по линиям Au4f_{7/2} (84,00 эВ) и Cu2p_{3/2} (932,67 эВ). Давление остаточных газов в ходе записи не превышало 3×10⁻⁷ Па. Образцы закрепляли на стальных держателях с помощью проводящего двухстороннего скотча 3М®. Обработку данных проводили с использованием программы XPSPEAK 4.1 с учётом факторов атомной чувствительности из руководства [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом электроспиннинга были изготовлены 3D-матриксом, содержащие ПКЛ в качестве синтетического полимера и белки ЧСА или Жл. Концентрацию ЧСА варьировали от 0,4% до 30%, Жл – от 0,5% до 10%. 3D-матриксом с концентрацией белка более 50% при намокании меняли структуру волокон и поэтому были исключены из исследования. По данным сканирующей электронной микроскопии, все 3D-матриксом представляли собой волокнистые материалы с диаметром волокон 0,6×1,7 мкм (рис. 1А). По данным микроскопии высокого разрешения, волокна имели равномерно гладкую поверхность (рис. 1Б).

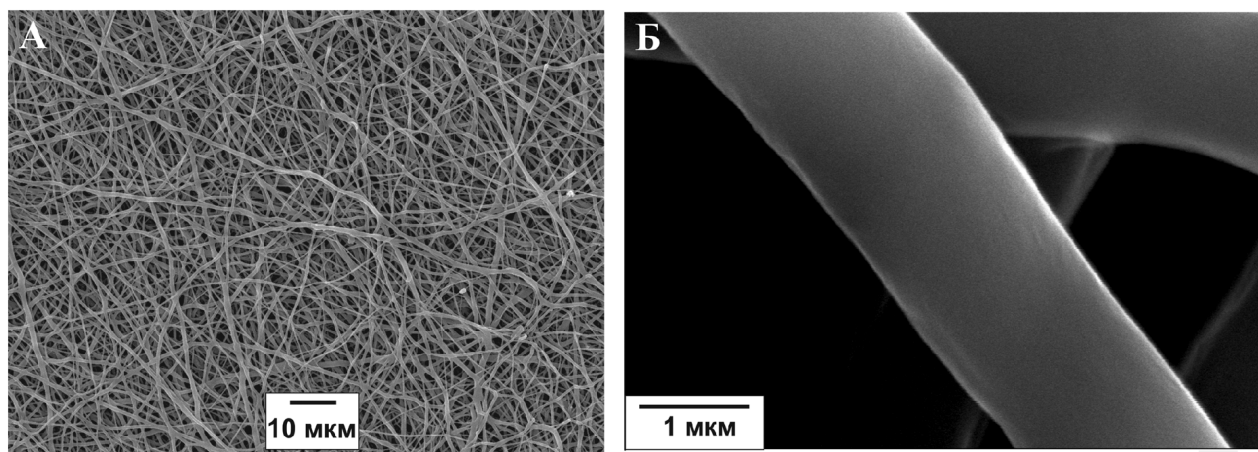


Рисунок 1. Изображения поверхностного слоя 3D-матрикса (А) и волокна (Б), изготовленных методом электроспиннинга из раствора 5% ПКЛ с 10% ЧСА, полученные сканирующей электронной микроскопией.

Для определения количества ЧСА, расположенного на поверхности 3D-матрикса, содержащих белок в различной концентрации, была использована модификация аминокрупп белка Фен с последующей оптической детекцией ковалентных аддуктов на длине волны 521 нм. Количество аминокрупп белка, ковалентно связанных с Фен, было рассчитано с использованием молярного коэффициента поглощения Фен в комплексе с аминоксодержащим соединением, рассчитанным в статье [21]. В качестве контроля неспецифической сорбции Фен на матриксе были использованы матриксы, изготовленные из ПКЛ без добавления белка. Результаты химической модификации ЧСА в матриксах приведены на рисунке 2. Увеличение концентрации белка в составе матрикса от 0,4% до 10% приводило к пропорциональному росту количества модифицированных аминокрупп ЧСА. В результате обработки матриксов протеиназой К с последующей химической модификацией было показано, что на поверхности матриксов в зависимости от исходной концентрации ЧСА наблюдается уменьшение количества экспонированных аминокрупп на 20-27% (рис. 2). Таким образом, часть полипептидной цепи ЧСА доступна для ферментативного гидролиза и, по-видимому, не имеет тесных контактов с матриксом, в то время как оставшиеся полипептиды формируют тесные контакты с ПКЛ.

Максимальная степень модификации ЧСА может быть определена, исходя из аминокислотной последовательности белка [24], включающей 60 остатков лизина и одну концевую аминокгруппу белка. Однако для того, чтобы оценить реальную степень модификации белка Фен и точно определить концентрацию поверхностного белка после модификации матриксов Фен, необходимо разделить модифицированный и немодифицированный (не экспонированный на поверхности и недоступный для модификации Фен) белок. Несмотря на то, что 3D-матриксы, модифицированные Фен хорошо растворяются в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол, нам не удалось найти способов количественного

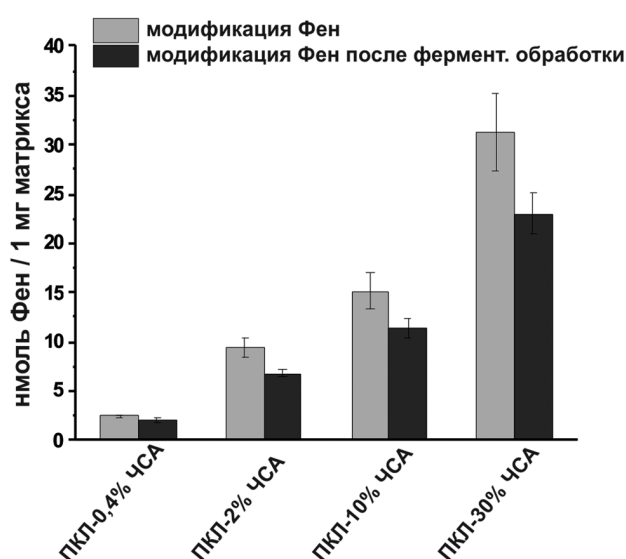


Рисунок 2. Зависимость ковалентного связывания Фен с 3D-матриксом от концентрации ЧСА в исходном растворе для электроспиннинга. Данные представлены как среднее трёх повторов \pm стандартное отклонение.

разделения компонентов из полученного раствора, и, таким образом, оценить степень модификации экспонированного на поверхности матрикса белка.

Для определения количества белка (ЧСА или ЖЛ), экспонированного в поверхностном слое 3D-матрикса, был использован метод РФЭС, позволяющий получить количественные данные об элементном составе материала, а также об электронном состоянии атомов в поверхностном слое материала толщиной ~ 10 нм. На начальном этапе спектроскопического анализа был исследован матрикс, состоящий из ПКЛ. В спектре наблюдаются только линии углерода и кислорода (водород методом РФЭС не детектируется), атомное отношение С:О составляет 2,96:1 (в пределах точности метода) и совпадает со стехиометрическим содержанием элементов в ПКЛ. В РФЭС-спектрах образцов, содержащих различное количество белка (ЧСА или ЖЛ), дополнительно наблюдается линия

ИССЛЕДОВАНИЕ 3D-МАТРИКСОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

азота (хорошо описываемая одним пиком), причём интенсивность сигнала N1s растёт с повышением концентрации белка в растворе (рис. 3). При этом форма спектра C1s также претерпевает изменения из-за появления дополнительного состояния углерода в составе пептидной связи.

Поскольку стехиометрические составы ПКЛ и ЧСА известны (табл. 1), можно арифметически рассчитать соотношения полимера и белка в поверхностном слое исследованных образцов, исходя из полученных данных об элементном составе поверхностного слоя. Однако, для проверки корректности такого подхода, необходимо выяснить, отвечает ли структура спектров C1s исследованных образцов приведённым выше оценкам. Разложение спектра линии C1s образца чистого ПКЛ на компоненты показало, что спектр легко раскладывается на три компоненты с соотношением 65,5:19,5:15, что близко к стехиометрическому соотношению 66:17:17 (рис. 4).

Таблица 1. Элементный состав компонент 3D-матрикса

	N	C	O	H	S
ЧСА	1	3,74	1,12	5,83	0,05
ПКЛ	0	3	1	5	0
Жл*	1	3,4	1,2	н/д**	н/д**

Примечание: * - по данным элементного анализа методом РФЭС; ** - нет данных.

Затем спектр углерода для образца с 30% белком, подвергнутого ферментативной обработке, был разложен на две составляющие. Первая полностью воспроизводила спектр чистого ПКЛ, причём интегральная интенсивность этой части спектра соответствовала ранее арифметически рассчитанной доле ПКЛ в этом образце. Для правильной репрезентации оставшейся части спектра использовалось соотношение форм углерода, рассчитанное из состава ЧСА (см. табл. 2). Оказалось, что спектр C1s можно разложить на четыре составляющие в отношении 50:25:21:4 с точными значениями спектроскопических параметров (см. рис. 4) для всех исследованных образцов, что дополнительно подтверждает адекватность “арифметического” подхода к анализу содержания белка в поверхностном слое матрикса.

Таблица 2. Число атомов и соотношение различных состояний углерода в молекуле ЧСА

Тип углерода	CH _x	CNH	CONH	CON	COOH
Число атомов	1481	774	645	76	99
Атомная доля	0,482	0,252	0,21	0,025	0,032

Метод РФЭС был использован и для оценки содержания белка в поверхностном слое матрикса, состоящих из ПКЛ с Жл. Поскольку Жл является продуктом гидролиза коллагенов, для оценки содержания азота методом РФЭС были проанализированы два образца: порошкообразный препарат Жл и матрикс, изготовленный электроспиннингом из чистого Жл. Было обнаружено, что элементный состав Жл исследованных образцов одинаков и стехиометрическое соотношение элементов в обоих образцах составляет C:N=3,4 и O:N=1,2.

На рисунке 5 приведены количественные данные распределения ЧСА в составе различных матрикса, полученные с помощью РФЭС. Они показывают, что изменение концентрации ЧСА в поверхностном слое матрикса зависит от его концентрации в растворе для электроспиннинга. В частности, при концентрации белка в растворе ≤2%, количество регистрируемого азота в поверхностном слое матрикса прямо пропорционально его содержанию в растворе, который был использован для приготовления матрикса, а при более высоких концентрациях белка линейный коэффициент заметно меньше единицы. Таким образом, при превышении критической концентрации ЧСА (~2%), количество ПКЛ в поверхностном слое матрикса уменьшается, а белка – увеличивается. В связи с этим, можно предположить экранирование части сигнала азота вышележащими фрагментами белка и, учитывая размеры белковой глобулы [25], формирование плотной или многослойной структуры белкового слоя.

Данные о количестве ЧСА в поверхностном слое матрикса после ферментативной обработки (рис. 5), полученные РФЭС, свидетельствуют о том, что с поверхности матрикса удаляется не более 35% белка. Эти результаты сопоставимы с данными, полученными в результате химической модификации матрикса с использованием Фен (рис. 2).

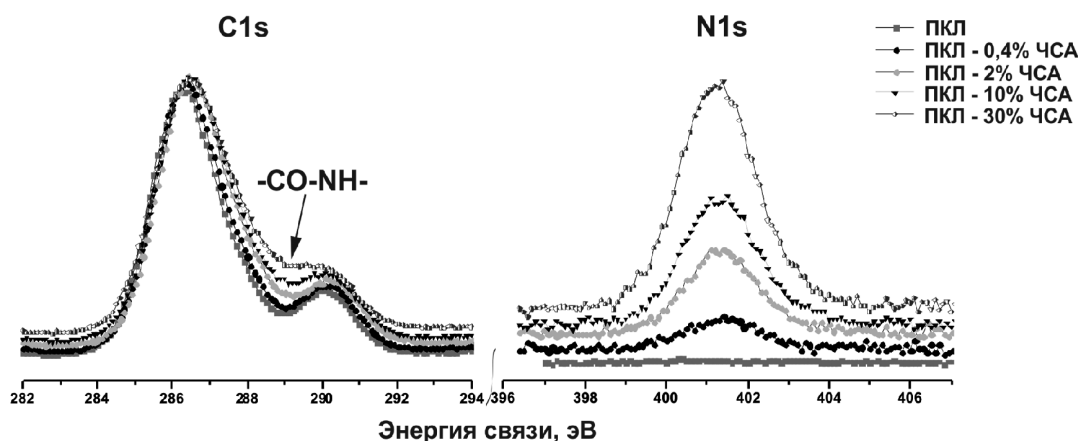


Рисунок 3. Спектры C1s и N1s для 3D-матрикса, содержащих ЧСА в разной концентрации (данные РФЭС).

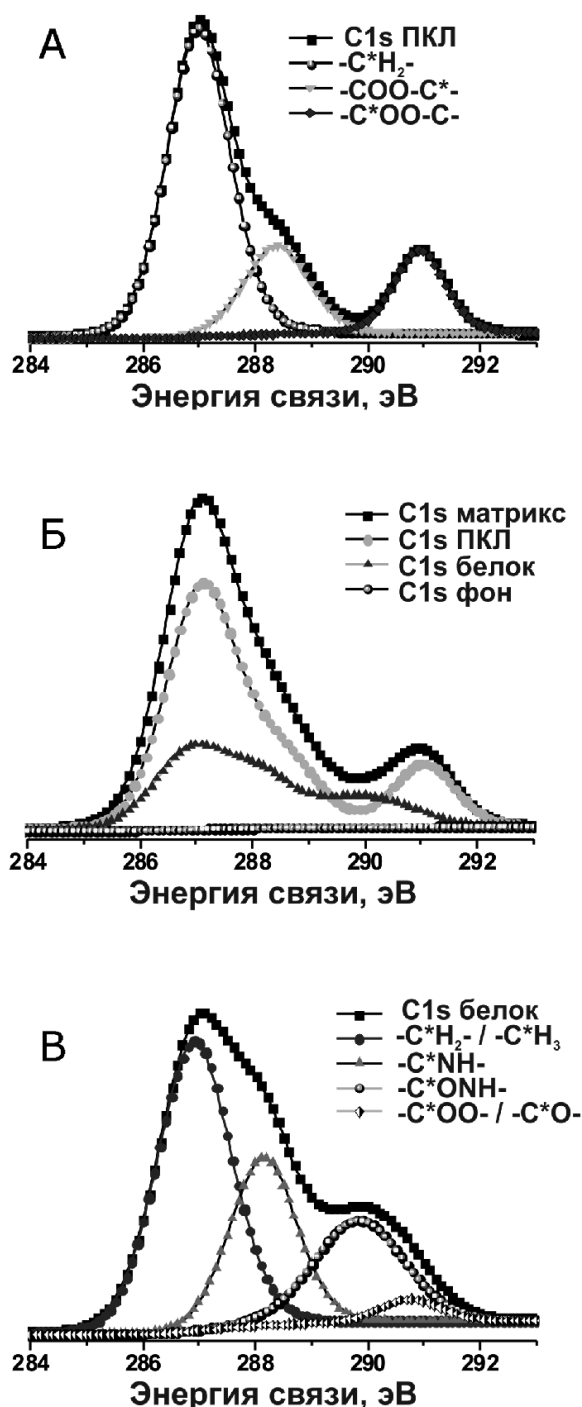


Рисунок 4. Спектры углерода для различных 3D-матриц (данные РФЭС). А - разложение спектров линии C1s для матриц, состоящих из чистого ПКЛ, Б - суммарный спектр вкладов C1s спектров от чистого ПКЛ и от белка в образце матрикса ПКЛ-30% ЧСА после ферментативной обработки, В - разложение спектра линии C1s от белка.

Данные, полученные методом РФЭС, для матриц, состоящих из ПКЛ с ЖЛ, показывают, что концентрация ЖЛ в поверхностном слое матриц так же зависит от концентрации белка в растворе для электрооспиннинга, как и в случае с ЧСА (см. рис. 6). Однако в области низких концентраций ЖЛ экспонирован на матриксах в меньшей степени по сравнению с ЧСА. Действительно, в поверхностном

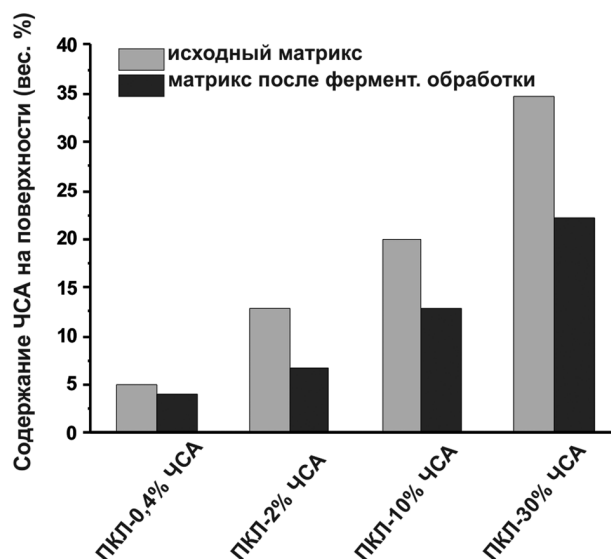


Рисунок 5. Количественное содержание ЧСА в поверхностном слое матриц, состоящих из смесей ПКЛ с ЧСА по данным РФЭС.

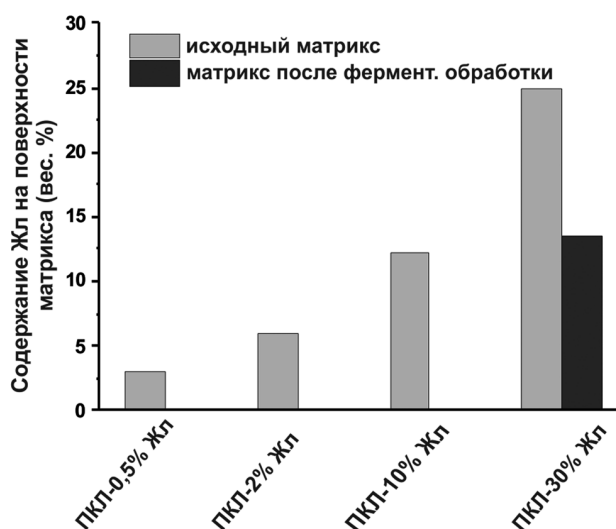


Рисунок 6. Количественное содержание ЖЛ в поверхностном слое матриц по данным метода РФЭС.

слое матриц, содержащих 2% белка в растворе для электрооспиннинга, наблюдается в 2 раза больше ЧСА по сравнению с ЖЛ, а при 10% концентрации белка – количество ЖЛ сопоставимо с количеством ЧСА в поверхностном слое матриц.

ЖЛ на поверхности матриц более доступен для гидролиза протеиназой К (рис. 6). Обработка матриц ферментом приводит к удалению 46% ЖЛ, экспонированного в поверхностном слое, в то время как в случае ЧСА удаляется не более 35% белка. Необходимо отметить, что используемый в работе ЖЛ из кожи свиньи представляет собой лизат коллагенов, состоящий из набора фрагментов фибриллярного белка. Поэтому очевидно, что связывание полипептидов разной длины с ПКЛ, механизмы их взаимодействия и доступность пептидов для ферментативного гидролиза, высвобождение пептидов после гидролиза могут существенно отличаться для препаратов ЧСА и ЖЛ.

Таким образом, при помощи метода РФЭС было показано, что в поверхностном слое волокон 3D-матрикса, изготовленных методом электроспиннинга из раствора ПКЛ с белком, соотношение белок : ПКЛ отличается от такового в исходном растворе полимеров 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропаноле. В целом, в поверхностном слое волокон концентрация белка выше, чем концентрация белка в исходном растворе для электроспиннинга. Причем при использовании растворов с низкой концентрацией белка в растворе концентрация белка в поверхностном слое может быть выше в 10 и более раз. Эти данные позволяют минимизировать количество белка, необходимого для улучшения связывания клеток с матриксом, и, следовательно, уменьшить как расход белка, так и его влияние на иммунную систему. Кроме того, данные о неравномерном распределении белка в волокне необходимы для рационального дизайна систем доставки как белковых, так и низкомолекулярных препаратов из матриксов. Как уже упоминалось во введении, белок вводят в состав волокна для улучшения заселения матриксов клетками [9, 10, 20], однако состав и строение поверхностного слоя волокон таких матриксов ранее не было изучено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РФЭС является удобным методом исследования поверхностного слоя матриксов, изготовленных методом электроспиннинга из смеси полимеров, особенно, если синтетический полимер не содержит атомов азота. Данные о представленности белка в поверхностном слое матрикса в зависимости от его концентрации в исходном растворе, представляют интерес для рационального дизайна тканеинженерных конструкций, поскольку позволяют оценить иммуногенность матрикса, строение поверхностного слоя, прогнозировать эффективность взаимодействия матриксов с клетками и, таким образом, биосовместимость матриксов, изготовленных методом электроспиннинга.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 14-15-00493.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kai D., Liow S.S., Loh X.J. (2014) Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl., **45**, 659-670.
2. Garg T., Rath G., Goyal A.K. (2015) J. Drug Target., **23**, 202-221.

3. Василец В.Н., Казбанов И.В., Ефимов А.Е., Севастьянов В.И. (2009) Вестник трансплантологии и искусственных органов, **11**, 47-53.
4. Антонова Л.В., Матвеева В.Г., Барабан Л.С. (2015) Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, **3**, 12-22.
5. Ren X., Feng Y., Guo J., Wang H., Li Q., Yang J., Hao X., Lu J., Ma N., Li W. (2015) Chem. Soc. Rev., **44**, 5680-5742.
6. Pauly H.M., Kelly D.J., Popat K.C., Trujillo N.A., Dunne N.J., McCarthy H.O., Haut Donahue T.L. (2016) J. Mech. Behav. Biomed. Mater., **61**, 258-270.
7. Xie J., MacEwan M.R., Li X., Sakiyama-Elbert S.E., Xia Y. (2009) ACS Nano, **3**, 1151-1159.
8. Castellano D., Blanes M., Marco B., Cerrada I., Ruiz-Sauri A., Pelacho B., Arana M., Montero J.A., Cambra V., Prosper F., Sepulveda P. (2014) Stem Cells Dev., **23**, 1479-1490.
9. Chen J.P., Su C.H. (2011) Acta Biomater., **7**, 234-243.
10. Zander N.E., Orlicki J.A., Rawlett A.M., Beebe T.P. (2010) Biointerphases, **5**, 149-158.
11. Singh S., Wu B.M., Dunn J.C. (2011) Biomaterials, **32**, 2059-2069.
12. Kurpinski K.T., Stephenson J.T., Janairo R.R., Lee H., Li S. (2010) Biomaterials, **31**, 3536-3542.
13. Mattanavee W., Suwantong O., Puthong S., Bunaprasert T., Hoven V.P., Supaphol P. (2009) ACS Appl. Mater. Interfaces, **1**, 1076-1085.
14. Yoo H.S., Kim T.G., Park T.G. (2009) Adv. Drug Deliv. Rev., **61**, 1033-1042.
15. Ko Y.M., Choi D.Y., Jung S.C., Kim B.H. (2015) J. Nanosci. Nanotechnol., **15**, 192-195.
16. Esfahani H., Prabhakaran M.P., Salahi E., Tayebifard A., Keyanpour-Rad M., Rahimpour M.R., Ramakrishna S. (2015) J. Colloid. Interface Sci., **443**, 143-152.
17. Nielsen S.R., Besenbacher F., Chen M. (2013) Phys. Chem. Chem. Phys., **15**, 17029-17037.
18. Lim J.S., Ki C.S., Kim J.W., Lee K.G., Kang S.W., Kweon H.Y., Park Y.H. (2012) Biopolymers, **97**, 265-275.
19. Pezeshki-Modaress M., Mirzadeh H., Zandi M. (2015) Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl., **48**, 704-712.
20. Kim B.S., Park K.E., Kim M.H., You H.K., Lee J., Park W.H. (2015) Int. J. Nanomedicine, **10**, 485-502.
21. Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.P. (1992) Bioconjug. Chem., **3**, 414-419.
22. Zander N.E., Orlicki J.A., Rawlett A.M., Beebe T.P. (2012) ACS Appl. Mater. Interfaces, **4**, 2074-2081.
23. Moulder J.F., Stokle W.F., Sobol P.E., Bomben K.D. (1992) Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy. Physical Electronics Division, Perkin-Elmer Corporation.
24. Minghetti P.P., Ruffner D.E., Kuang W.J., Dennison O.E., Hawkins J.W., Beattie W.G., Dugaiczak A. (1986) J. Biol. Chem., **261**, 6747-6757.
25. Ferrer M.L., Duchowicz R., Carrasco B., de la Torre J.G., Acuna A.U. (2001) Biophys. J., **80**, 2422-2430.

Поступила: 14. 09. 2016.
Принята к печати: 25. 10. 2016.

INVESTIGATION OF THE SURFACE LAYER OF 3D-MATRICES FOR TISSUE ENGINEERING

V.S. Chernonosova^{1,2}, R.I. Kvon³, E.V. Kiseleva⁴, A.O. Stepanova^{1,2}, P.P. Laktionov^{1,2}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8 Lavrentiev av., Novosibirsk, 630090 Russia, tel.: (383)363-51-44; fax: (383) 363-51-53;

e-mail: vera_mal@niboch.nsc.ru

²Meshalkin Siberian Federal Biomedical Research Center, Novosibirsk, Russia

³Boreskov Institute of Catalysis Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Electrospinning is a convenient and promising manufacturing method a variety of materials for tissue engineering. 3D matrices fabricated by electrospinning from solutions of polycaprolactone with human serum albumin or gelatin in 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol were studied. The microstructure of the 3D matrices and surface of the fibers were investigated using scanning electron microscopy. Protein distribution in the surface layer was studied by modification of protein amino groups with N-(2-hydroxyethyl)phenazine and X-ray photoelectron spectroscopy. It was shown, that concentration of the proteins in the surface layer of fibers exceeded their concentration in the initial electrospun solution up to 12 times and the surface layer was enriched in the protein inversely to the concentration of the protein in solution. The minor part of the proteins was released from fibers during first 30-60 min after swelling in water. Treatment of matrices with proteinase K hydrolyzed about 1/3 of the surface exposed human serum albumin. Thus, both methods can be used to study the surface content of the materials produced by electrospinning from blends of synthetic and natural polymers, however X-ray photoelectron spectroscopy appears to be more convenient and informative.

Key words: 3D-matrices, synthetic and natural polymers, electrospinning, X-ray photoelectron spectroscopy, chemical modification