

Электростимуляция дермальных фибробластов человека на электропроводящей матрице

© К.А. Колбе,^{1,2} М.А. Шишов,^{1,2} И.Ю. Сапурина,² Н.В. Смирнова,^{1,2} В.В. Кодолова-Чухонцева,¹ Е.Н. Дресвянина,¹ А.М. Камалов,¹ В.Е. Юдин^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, Россия

² Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: nvsmirnoff@yandex.ru

Поступило в Редакцию 27 мая 2021 г.

В окончательной редакции 10 августа 2021 г.

Принято к публикации 11 августа 2021 г.

Электропроводящий композит на основе биосовместимого хитозана и одностенных углеродных нанотрубок использован в качестве матрицы для электростимуляции фибробластов человека. Изучены характеристики ионных и электронных токов, протекающих по матрице при наложении циклических потенциалов ± 100 mV, установлена высокая стабильность матрицы в ходе продолжительного циклирования. Показано, что предварительная электростимуляция повышает пролиферативную активность дермальных фибробластов человека в сравнении с интактными клетками.

Ключевые слова: композит хитозан-углеродные нанотрубки, электростимуляция, дермальные фибробласты.

DOI: 10.21883/JTF.2021.12.51772.160-21

Введение

Методы электростимуляции широко применяются в медицине как для лечения широкого спектра заболеваний, так и для их диагностики. Установлено, что воздействие слабыми импульсными токами усиливает активность периферической и центральной нервной систем, вызывая в них ответную реакцию. Это помогает восстанавливать функции опорно-двигательного аппарата, стимулировать дыхание и сердцебиение, лечить заболевание глаз и слухового аппарата. Электростимуляция тормозит атрофические и склеротические изменения, стимулируя одновременно восстановительные процессы в системах кровообращения, лимфооттока и обмена веществ, что активно используется регенеративной медициной [1].

Для оптимизации протоколов электростимуляции в настоящее время исследуются базовые механизмы, задействованные в терапевтических подходах. К таким механизмам относится изменение под действием экзогенной электростимуляции поведения клеток в части их пролиферативной активности, программируемой гибели, дифференцировки и др. Так, показано, что использование постоянного тока и электродов с повышенными емкостными свойствами стимулирует пролиферацию и рост мезенхимных стволовых клеток костного мозга, что обеспечивает эффективное восстановление костной ткани после переломов. Биполярная электрическая стимуляция увеличивает скорость регенерации сенсорных и двигательных нервов и успешно использована при лечении синдрома запястного канала человека [2]. По-

видимому, существует еще не раскрытый потенциал использования электростимуляции для противоопухолевой терапии, лечения келоидных заболеваний, нарушения иннервации тканей, атрофии скелетных мышц и т.д. [2]. В ряде клинических испытаний *in vivo* и *in vitro* была продемонстрирована положительная реакция на электростимуляцию фибробластов дермы, ведущая к улучшению заживления повреждений кожи и мягких тканей [3].

В настоящее время регенеративная медицина все чаще применяет неинвазивные методы лечения и диагностики, для которых необходимы биосовместимые электропроводящие материалы, не травмирующие живую ткань. Подобные материалы нужны и новому биомедицинскому направлению — клеточной терапии, где методы электростимуляции используются для модуляции и ускорения роста клеточных культур, используемых для лечения [4,5]. Биосовместимые электропроводящие материалы, пришедшие на замену традиционных металлических электродов, как правило, представляют собой композиты биосовместимых полимеров-диэлектриков и электропроводящей компоненты. Роль электропроводящей компоненты выполняет либо углерод, либо электропроводящий полимер [5–8].

Углеродные материалы стабильны, инертны, нетоксичны и обладают высоким уровнем электронной проводимости. В качестве электропроводящей компоненты используются различные углеродные аллотропии: углеродная сажа, графен, углеродные нанотрубки [9]. Однако углеродные нанотрубки применяются наиболее часто, поскольку одномерная форма частиц позволяет значи-

тельно снизить перколяционный порог проводимости и получить требуемые параметры проводимости при минимальном содержании углерода

Одним из наиболее известных и доступных биосовместимых материалов является хитозан. Это полисахарид, получаемый из биомассы: панцирей креветок, крабов, саранчи и т.д. Среди биосовместимых полимеров, по масштабам производства и по доступности, хитозан занимает второе место после производных целлюлозы [10]. Хитозан не только биосовместимый, но и биodeградируемый полимер и обладает также бактерицидными свойствами [11]. Пленки на основе хитозана, сочетающие превосходные механические и антибактериальные свойства, используют для упаковки скоропортящихся продуктов [12], полимер применяют для антибактериальной очистки питьевой воды [13] и выведения из организма продуктов разложения лекарственных препаратов [14,15].

Композиты хитозана и углеродных нанотрубок получены рядом авторов [16–19]. Изучены их оптические, механические и электропроводящие свойства [20,21]. Однако характеристики каждого композита индивидуальны. Они зависят от множества факторов: типа углеродных нанотрубок, молекулярных характеристик хитозана, массового соотношения компонентов их распределения в композите и т.д. Поэтому при получении таких композитов первоочередной задачей является адаптация материала для конкретного варианта применения.

В настоящей работе композит хитозана с одностенными углеродными нанотрубками получен для изучения влияния электростимуляции на дермальные фибробласты, задействованные в регенерации при повреждениях кожи и мягких тканей. Кратко приведены условия получения композита, его состав и свойства. Изучены характеристики материала при наложении на него циклического потенциала как на воздухе, так и в физиологическом растворе. Исследовано влияние электростимуляции на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека путем использования электропроводящей композитной матрицы в качестве подложки.

1. Материалы и методы

1.1. Материалы

Композит готовили из 4%-х водных растворов хитозана (CS) (Biolog Нерре GmbH, Германия, $M_n = (1.64–2.1) \times 10^5$, $DD = 92\%$) и водной суспензии одностенных углеродных нанотрубок (SWCNT) (Carbon Chg, Россия). Выбор именно 4.0 wt.% концентрации CS в растворе обусловлен тем, что, как установлено ранее, это оптимальная концентрация полимера для коагуляционного прядения хитозановых волокон [22]. Перед приготовлением растворов водная суспензия, содержащая SWCNT, была диспергирована с использованием ультразвукового диспергатора IL10-0.63 в течение 15 min при частоте 25 kHz и мощности 630 W. Порошок CS вводили

в полученную водную суспензию при перемешивании для достижения набухания и частичного растворения CS. Затем в систему вводили уксусную кислоту до концентрации 2 wt.% для полного растворения CS. После 3 h перемешивания раствор фильтровали и деаэрировали в вакуумной камере в течение 24 h при давлении 10 kPa. Содержание SWCNT составляло 3 wt.% по отношению к CS.

Пленки CS–SWCNT отливали путем экструзии раствора через щелевую фильеру на стеклянную подложку; за отливкой следовала сушка при температуре 50°C в течение 1 h. Далее пленки на стеклянной подложке деаэрировали в вакуумной камере в течение 24 h при давлении 10 kPa и затем сушили на воздухе при комнатной температуре в течение еще 24 h. Полученные пленки выдерживали в 10%-ом водном растворе, содержащем NaOH и C₂H₅OH (1:1), в течение 10 min, затем промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе [23,24]. Пленки, отлитые из полученных растворов, были гомогенными и однородно черными.

Исследование электропроводности проводили в изотермических условиях при $22 \pm 2^\circ\text{C}$ с помощью четырехэлектродной системы. Источником тока служил пикоамперметр источник Keithley 6487, а для регистрации разности потенциалов применялся милливольтметр В7-40/4.

Механические свойства исследовали на приборе Instron 5943, база испытания 10 mm, скорость растяжения образца 10 mm/min. Перед испытаниями на растяжение образцы пленок выдерживали в эксикаторе при относительной влажности воздуха 66% не менее 24 h.

1.2. Исследования *in vitro*

Для проведения исследований использовали штамм фибробластов кожи условно здорового донора, полученный из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в полной питательной среде ДМЕМ (Панэко, Россия) с добавлением 1% L-глутамин 200 mM, 10% бычьей эмбриональной сыворотки и 1% антибиотиков (100 units/ml пенициллин, 100 µg/ml стрептомицин), 1% антимикотика (амфотерицин В 250 µg/ml) (все реактивы Thermo Fisher Scientific, США). Культивирование проводили в CO₂ инкубаторе (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре 37°C, концентрации CO₂ 5% и повышенной влажности. Для проведения исследований использовали клетки до 15 пассажа.

1.3. Оборудование для проведения электростимуляции

Эксперименты по электростимуляции дермальных фибробластов человека на электропроводящей матрице CS–SWCNT проводили с использованием прибора Potentiostat/Galvanostat ELINS P-30J, который позволяет регистрировать токи в диапазоне от 10 nA до 2 A и

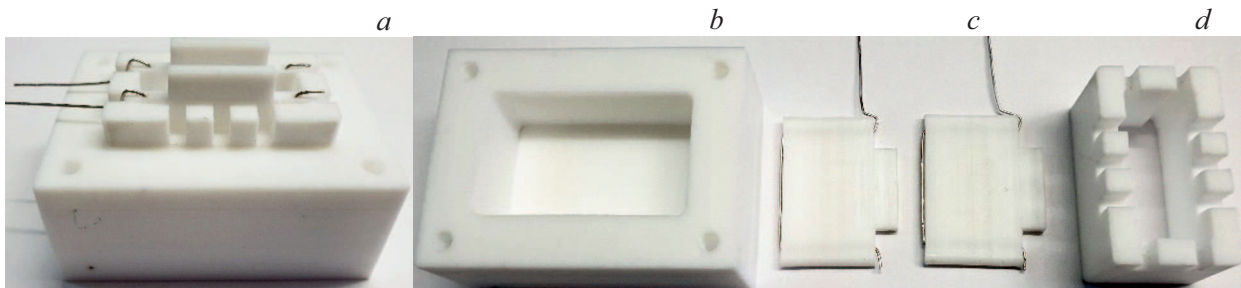


Рис. 1. *a* — ячейка для электростимуляции в сборе и элементы ячейки, *b* — ванна, *c* — электроды, *d* — фиксирующая рамка.

потенциалы в диапазоне $80\ \mu\text{V}$ – $15\ \text{V}$. Возможная форма развертки сигналов тока и потенциала во времени включает стационарный, пилообразный, П-образный, импульсный и программируемый. Максимальная скорость регистрации $1580\ \text{points/s}$.

Электростимуляцию клеток проводили в специально разработанной ячейке, выполненной из цельного куска тефлона и не имеющей клеевых соединений (рис. 1). На дно ячейки помещали электропроводящую матрицу и заливали электролит либо культуральную среду. Съёмные электроды, которые фиксировались в пазах корпуса ячейки, накладывались на образец сверху. Электрод представлял собой тефлоновую пластину с закрепленной на торце платиновой проволокой. Потенциал подавали на образец через электрод из платиновой проволоки диаметром $1\ \text{mm}$, закрепленный в нижней части пластины. Расстояние между параллельными электродами составляло $9\ \text{mm}$.

1.4. Электростимуляция и исследование пролиферативных особенностей клеток

Электростимуляцию проводили на пленках CS–SWCNT, многократно промытых физиологическим раствором с нейтральным pH и стерилизованных в автоклаве (120°C , $40\ \text{min}$) непосредственно перед экспериментами с клеточным материалом. Стерилизацию осуществляли в ячейке для электростимуляции, где CS–SWCNT-пленка находилась на дне ванны и была зажата между двумя электродами. Питательную среду с клетками помещали в стерилизованную ячейку поверх электропроводящей пленки CS–SWCNT, клетки культивировали $24\ \text{h}$ в CO_2 инкубаторе (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре 37°C , концентрации CO_2 5% и повышенной влажности. Продолжительность электростимуляции составляла $4\ \text{h}$, в период электростимуляции ячейка с клетками находилась в CO_2 инкубаторе. С помощью потенциостата на образец подавали циклический П-образный сигнал со сменой полярности через каждые $30\ \text{s}$ с верхней и нижней границей потенциала $+100$ и $-100\ \text{mV}$ соответственно.

Долговременное наблюдение за ростом клеток в режиме реального времени проводили с использованием системы RTCA iCELLigence (ACEA Biosciences, Inc.,

США) (рис. 2, *a*), позволяющей анализировать состояние клеточных культур в динамике по изменению импеданса. В каждой лунке планшета E-Plates L8, используемого в системе, находится совокупность золотых встречно-штыревых электродов, которая позволяет измерять сопротивление, создаваемое клетками (рис. 2, *b*). Адгезия, распластывание и пролиферация клеток на поверхности электродов повышают сопротивление среды (рис. 2, *c*) и регистрируются как клеточный индекс: отношение импеданса в конкретный момент времени к исходному значению импеданса. Для проведения данных исследований клетки с поверхности CS–SWCNT-матриц, прошедшие цикл электростимуляции, а также контрольные интактные клетки переносили в лунки планшета E-Plates L8.

2. Результаты и обсуждение

Пленки CS–SWCNT с $3\ \text{wt.}\%$ содержанием углеродной компоненты были однородными по толщине ($40\ \mu\text{m}$), и имели глубокую черную окраску, что свидетельствовало об однородном распределении SWCNT. Пленки обладали хорошими механическими свойствами, значения прочности, модуля упругости и деформации материалов приведены в таблице.

Электропроводность пленки CS + 3% SWCNT была изотропна и составляла $0.1 \pm 0.005\ \text{S/cm}$, это величина на 2 порядка выше электропроводности культуральной среды ($0.15 \cdot 10^{-2}\ \text{S/cm}$), следовательно, электрический ток будет преимущественно протекать по поверхности пленки CS + 3% SWCNT. Электропроводность хитозановых пленок с различным содержанием SWCNT была изучена в работе [25], где показано, что уменьшение концентрации SWCNT в композиционной пленке приводит к протеканию тока преимущественно по культуральной среде,

3. Электрические свойства матриц CS–SWCNT

В изготовленной ячейке проведено предварительное исследование образцов матриц CS–SWCNT как в сухом состоянии (22°C и влажность 40 – 60%), так и в растворе

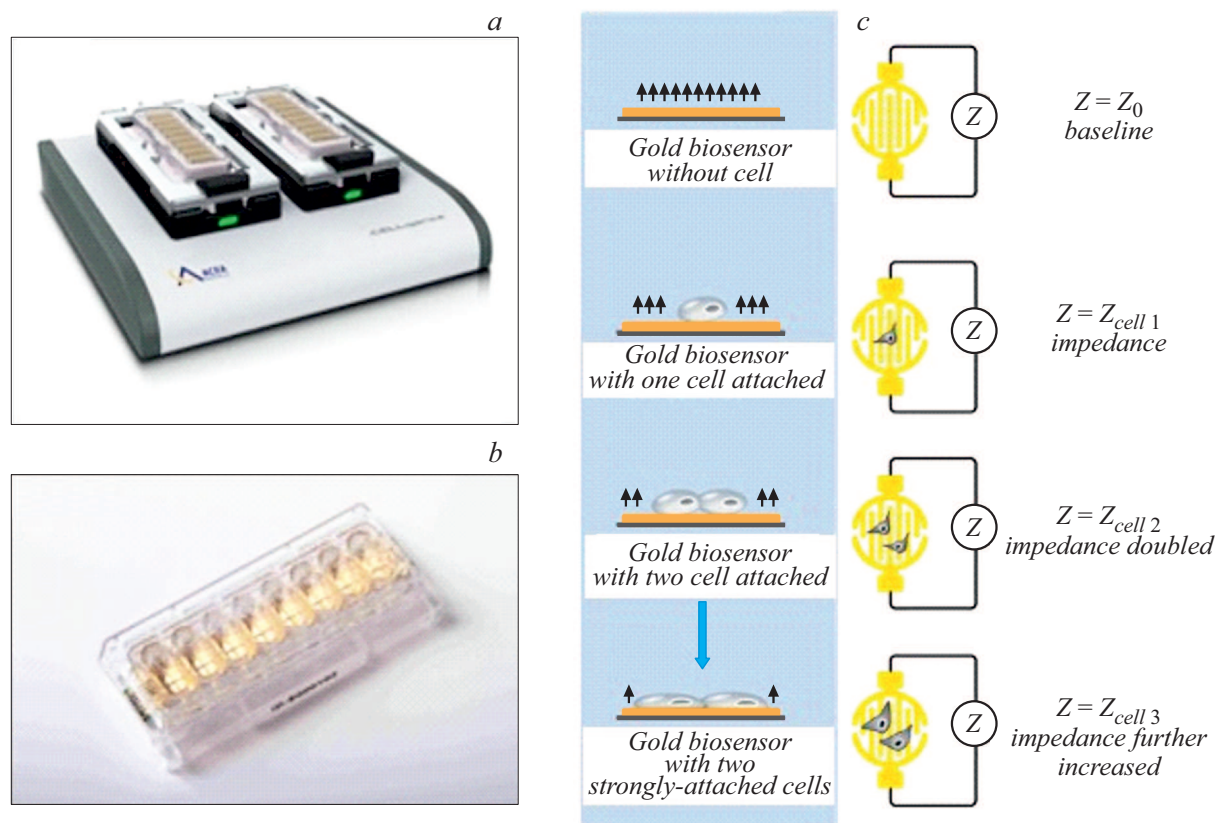


Рис. 2. *a* — RTCA iCELLigence анализатор клеток, работающий в режиме реального времени; *b* — электронный планшет E-Plates L8 (расстояние между лунками составляет 9 mm от центра до центра соседних лунок в соответствии со стандартом ANSI/SBS 4-2004 для 96-луночных микротитровальных планшетов); *c* — адгезия клеток ко дну электронного планшета влияет на локальную среду на границе раздела биосенсор/раствор, в результате чего возникает импеданс электрического тока (Z); импеданс варьируется в зависимости от количества и размера клеток, протяженности межклеточных контактов (барьерная функция клетки) и эффективности прикрепления клетки к субстрату.

электролита (ФР). Сухая матрица демонстрирует омическую вольт-амперную зависимость как в положительной, так и в отрицательной области исследуемых потенциалов (рис. 3). Однако при введении в ячейку ФР и намокании матрицы ее вольт-амперные характеристики резко меняются. Величины токов снижаются на порядок, и вольт-амперная зависимость имеет форму кривой с насыщением (рис. 3, вставка). Это объясняется тем, что композит CS–SWCNT состоит из проводников двух типов: проводника электронного типа — SWCNT и ионного проводника — CS [26]. В сухом состоянии ионная проводимость подавлена, наблюдается только электронный транспорт по SWCNT, образующий в матрице CS перколяционную сетку. В растворе электролита проявляется ионный транспорт, значительную роль в котором играет матрица CS. Хитозан содержит ионогенные аминогруппы, в кислой среде они протонируются и при 100% влажности и температуре 80°C способны обеспечить ионную проводимость порядка 10^{-3} S/cm, приемлемую для протон-проводящих мембран [26]. В физиологических условиях (25°C и на границе протонации (pH 6–7) ионная проводимость матрицы ниже, тем

Механические характеристики композиционных пленок CS–SWCNT

Пленки	Прочность, МПа	Модуль упругости, GPa	Деформация, %
CS	124.17 ± 5.42	2.62 ± 0.57	38.68 ± 4.84
CS + 3% SWCNT	158.91 ± 17.23	3.57 ± 0.26	41.16 ± 5.82

не менее она оказывает значительное влияние на ток в системе. Ионный транспорт создает на интерфейсе электрода двойной электрический слой, в результате чего эффективное напряжение электродов снижается и ток уменьшается с десятков до единиц μA .

Вклад матрицы CS–SWCNT в образование двойного электрического слоя значительно выше, нежели водного электролита на границе с электродом, что видно при сопоставлении площадей под кривой соответствующих циклических вольтамперограмм (рис. 4). Таким образом, токи, проходящие по стимулируемой матрице, неоднородны и сложны не только по различию природы

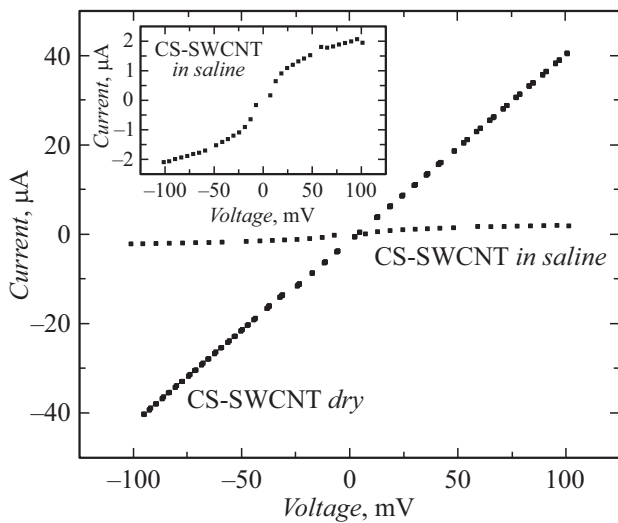


Рис. 3. Вольт-амперные характеристики матрицы CS-SWCNT в сухом состоянии и в электролите, температура 25°C, скорость сканирования потенциала 3 mV/s, данные получены в ячейке для электростимуляции (на вставке вольт-амперная зависимость в электролите детально).

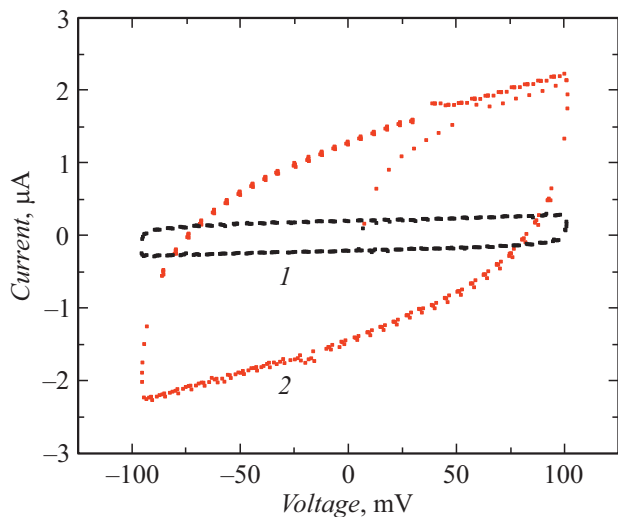


Рис. 4. Циклические вольтамперограммы: 1 — электролит; 2 — матрица CS-SWCNT в электролите, температура 25°C, скорость сканирования потенциала 3 mV/s, данные получены в ячейке для электростимуляции.

носителей, но и по смене интенсивности и направления их движения.

4. Электростимуляция дермальных фибробластов на поверхности матрицы CS-SWCNT

В процессе электростимуляции на матрицу CS-SWCNT, погруженную в культуральную среду, несущую на поверхности дермальные фибробласты человека,

подавался циклический П-образный сигнал со сменой полярности через каждые 30 s с верхней и нижней границ потенциала +100 и -100 mV соответственно. Продолжительность электростимуляции составляла 4 h, на протяжении которых ячейка с биологическим материалом находилась в CO₂ инкубаторе (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре 37°C, концентрации CO₂ 5% и повышенной влажности. Смена полярности сигнала была необходима для уменьшения явлений поляризации электродов ячейки в результате формирования на интерфейсе твердой и жидкой фаз двойного электрического слоя, и для поддержания среднего значения ниспадающего тока на уровне не менее 1 µA.

Форма подаваемого на образец потенциала и тока, протекающего через образец при стимуляции, в течение первых 5 min и на завершающем этапе, после 4 h стимуляции приведены на рис. 5. На приведенных графиках зависимости тока от времени регистрируется, что в ходе непрерывной 4 h электростимуляции электрическое сопротивление системы не увеличивается, что говорит о стабильности матрицы CS-SWCNT. Сигнал тока, протекающего через образец, имеет сложную форму. При подаче потенциала ток моментально принимает максимальное значение, однако затем плавно спадает до значений, близких к 1–2 µA вследствие поляризации электрода.

Как уже обсуждалось, и культуральная среда, и матрица CS-SWCNT являются ионпроводящими. Скорости установления электростатического равновесия с образованием двойного электрического слоя в водных растворах электролитов соответствуют килогерцовым частотам [27]. Таким образом, в условиях электростимуляции с частотами смены потенциала порядка сотых Hz явления поляризации со снижением эффективного потенциала электрода должны проявиться и приводить к закономерному уменьшению тока. На рис. 6 сопоставляются электронные токи, наблюдаемые на сухой матрице CS-SWCNT при наложении циклического П-образного потенциала, и реальные токи на матрице CS-SWCNT в культуральной среде. Видно, что реальные токи чередуются в соответствии со сменой потенциала, симметричны относительно нулевого потенциала и имеют ниспадающий вид. Среднее значение тока на матрице CS-SWCNT в культуральной среде значительно меньше, чем в сухой матрице CS-SWCNT.

5. Пролиферативные особенности культуры дермальных фибробластов после электростимуляции

После проведения электростимуляции клетки, находившиеся на матрице CS-SWCNT, были размножены в ходе 1 пассажа культивирования и перенесены на планшет клеточного анализатора RTCA iCELLigence, позволяющего регистрировать состояние клеточных куль-

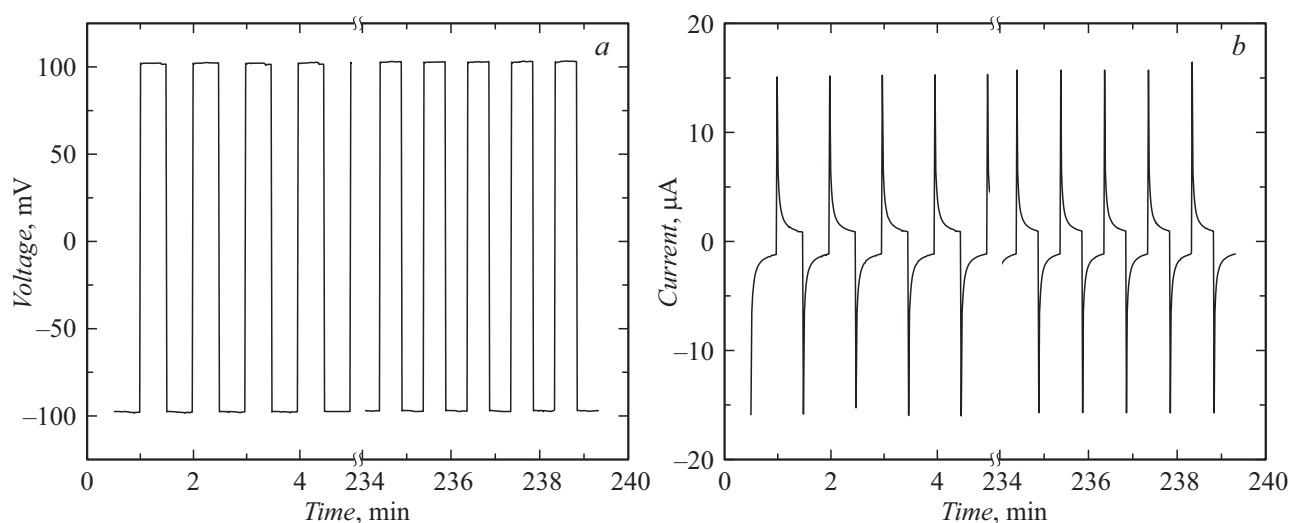


Рис. 5. Форма (а) подаваемого на образец CS-SWCNT потенциала (b) тока, протекающего через образец, при электростимуляции в течение первых 5 min и на завершающем этапе, после 4 h стимуляции. Продолжительность импульса 30 s.

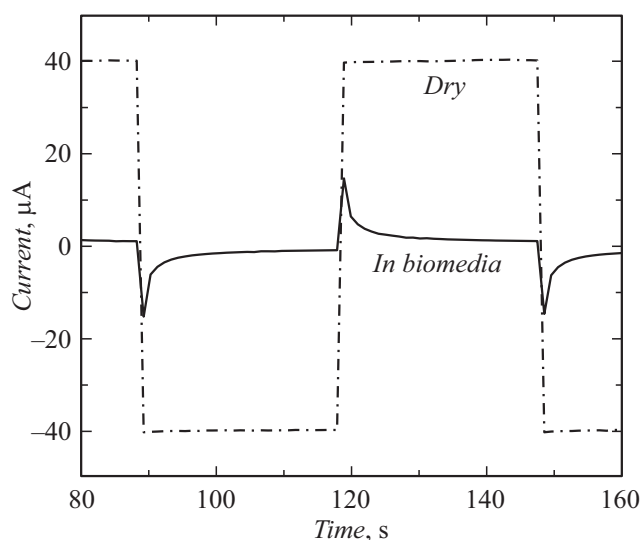


Рис. 6. Циклические токи, протекающие через сухую матрицу CS-SWCNT, и через тот же образец в культуральной среде при смене потенциала электродов от -100 до $+100$ mV каждые 30 s.

тур в динамике без дополнительного окрашивания. Наблюдение за ростом клеток проводили по изменению импеданса, создаваемого клетками в ячейке планшета, снабженной золотыми электродами. Адгезия, распластывание и пролиферация клеток на поверхности электродов повышают сопротивление среды и регистрируются как клеточный индекс (CI): отношение импеданса в конкретный момент времени к исходному значению импеданса.

На рис. 7 приведены данные об изменении во времени CI дермальных фибробластов, подвергшихся электростимуляции в сопоставлении с контрольными образца-

ми, без электростимуляции. В течение первых суток кривые CI, относящиеся к процессам адгезии и распластывания, у фибробластов после электростимуляции повторяют траектории контрольных клеток, при этом значения CI ниже, чем в контроле. Через 24 h культивирования и для стимулированных, и для контрольных клеток регистрируется рост кривой CI, соответствующий пролиферативной активности. Рост электростимулированных клеток значительно более динамичный, чем у контрольных клеток, он более продолжителен и приводит к большему значению CI на плато, которое соответствует образованию клеточного монослоя. После образования монослоя оба образца клеток демонстри-

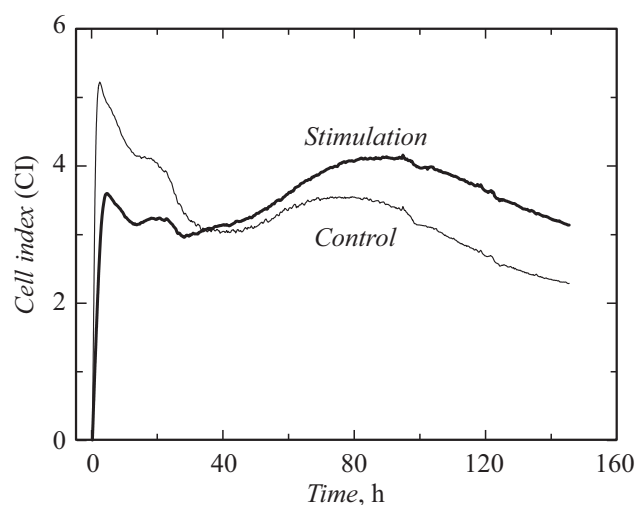


Рис. 7. Изменение клеточного индекса CI в процессе культивирования дермальных фибробластов человека на планшете клеточного анализатора RTCA iCELLigence. Сравнение CI для клеток, прошедших и не прошедших предварительную электростимуляцию на матрице CS-SWCNT.

руют закономерное затухание клеточной активности в следствие процессов контактного торможения, свойственных первичным нераковым клеткам.

В ряде работ показано, что клетки способны воспринимать и преобразовывать электрические поля, но реальный механизм этих процессов до сих пор не ясен и является предметом исследований. По-видимому, электрическое поле влияет на клетку опосредовано через плазматическую мембрану или ее белки. Это является вероятным объяснением снижения числа клеток, предварительно подвергшихся электростимуляции, которые адгезировали к поверхности электронных планшетов. В основе более длительных эффектов электростимуляции лежит изменение мембранного потенциала за счет перераспределения заряженных компонентов мембраны и взаимодействие с сигнальными механизмами клетки во время изменения концентрации ионов Ca^{2+} и АТФ [28–30]. Данные клеточные сигнальные каскады могут лежать в основе роста пролиферативной активности культуры дермальных фибробластов, подвергшихся электростимуляции, по сравнению с интактными клетками.

Заключение

Пленочный композит хитозана с 3-% содержанием одностенных углеродных нанотрубок, обладающий как электронным, так и ионным типом электропроводности и высокой стабильностью при циклировании потенциала, использован для электростимуляции дермальных фибробластов человека. После электростимуляции клетки были перенесены на планшет устройства RTCA iCELLigence, где наблюдение за ростом клеток проводилось в режиме реального времени. Показано, что на начальном этапе культивирования процессы адгезии и расплывания электростимулированных клеток менее интенсивны в сравнении с контролем. Однако по прошествии 24 h культивирования электростимулированные клетки демонстрируют более динамичный и быстрый рост и превосходят по уровню пролиферативной активности контрольные образцы. В приложении к регенеративным технологиям восстановления целостности кожных покровов и мягких тканей специализированные режимы электростимуляции с использованием электропроводящих матриц на основе CS–SWCNT могут быть использованы как для модуляции активности культуры дермальных фибробластов, применяемых далее в клеточной терапии, так и для местного воздействия на клетки в пределах поврежденных тканей.

Благодарности

Авторы благодарят Российский научный фонд за поддержку исследований в рамках гранта № 19-73-30003.

Финансирование работы

Финансирование исследований, представленных в работе, осуществлялось из средств гранта № 19-73-30003 Российского научного фонда.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] J. Day, J. Newman. *Curr. Orthop. Pract.*, **31** (4), 394 (2020). DOI: 10.1097/BCO.0000000000000889
- [2] M.R. Love, S. Palee, S.C. Chattipakorn, N. Chattipakorn. *J. Cell Physiol.*, **233**, 1860 (2018). <https://doi.org/10.1002/jcp.25975>
- [3] J. Hunckler, A. de Mel, J. Multidiscip. Healthcare, **10**, 179 (2017). <https://doi.org/10.2147/JMDH.S127207>
- [4] R. Feiner, L. Engel, S. Fleischer, M. Malki, I. Gal, A. Shapira, Y. Shacham-Diamand, T. Dvir. *Nat. Rev. Mater.*, **3** (1), 317076 (2018). DOI: 10.1038/nmat4590
- [5] V. Lundin, A. Herland, M. Berggren, E.W.H. Jager, A.I. Teixeira. *PLoS ONE*, **6** (4), e18624 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018624>
- [6] E.N. Zare, P. Makvandi, B. Ashtari, F. Rossi, A. Motahari, G. Perale. *J. Med. Chem.*, **63** (1), 1 (2020). DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00803
- [7] Y. Liu, P. Yin, J. Chen, B. Cui, Ch. Zhang, F.Wu. *Hindawi. Int. J. Polym. Sci.*, **2020**, 5659682 (2020). <https://doi.org/10.1155/2020/5659682>
- [8] I.Yu. Sapurina, V.V. Matrenichev, E.N. Vlasova, M.A. Shishov, E.M. Ivan'kova, I.P. Dobrovolskaya, V.E. Yudin. *Polym. Sci. Ser. B*, **62**, 116 (2020). DOI: 10.1134/S156009042001008X
- [9] M.J. Ahmeda, B.H. Hameed, E.H. Hummadic. *Carbohydr. Polym.*, **247**, 116690 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116690>
- [10] M. Rayung, M.M. Aung, Sh.Ch. Azhar, L.Ch. Abdullah, M.S. Su'ait, A. Ahmad, S.N.A. Md Jamil. *Materials*, **13** (4), 838 (2020). DOI: 10.3390/ma13040838
- [11] S. Bandara, H. Du, L. Carson, D. Bradford, R. Kommalapati. *J. Nanomater.*, **10** (10), 1903 (2020). DOI: 10.3390/nano10101903
- [12] A.P.A. de Carvalho, C.A. Conte. *Trends Food Sci. Technol.*, **103**, 130 (2020). DOI: 10.1016/j.tifs.2020.07.012
- [13] M.J. Ahmeda, B.H. Hameed, E.H. Hummadic. *Carbohydr. Polym.*, **247**, 116690 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116690>
- [14] K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski. *J. Control. Release*, **70** (1–2), 1 (2001).
- [15] L. Zheng, Sh. Wu, L. Tan, H. Tan, B. Yu. *J. Biomater. Appl.*, **31** (3), 379 (2016). DOI: 10.1177/0885328216651183
- [16] G. Lekshmi, S.S. Sana, V.-H. Nguyen, Th.H.Ch. Nguyen, Ch.Ch. Nguyen, Q. Van Le, W. Peng. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6440 (2020). DOI: 10.3390/ijms21176440
- [17] J. Venkatesana, BoMi Ryua, P.N. Sudhac, S.-K. Kima. *Int. J. Biol. Macromol.*, **50**, 393 (2012). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.12.032
- [18] L. Carson, C.K. Brown, M. Stewart, A. Oki, G. Regisford, Zh. Luo, V.I. Bakhmutov. *Mater. Lett.*, **63**, 617 (2009). DOI: 10.1016/j.matlet.2008.11.060

- [19] S. Pok, F. Vitale, Sh.L. Eichmann, O.M. Benavides, M. Pasquali, J.G. Jacot. *ASC Nano.*, **8** (10), 9822 (2014). DOI: 10.1021/nn503693h
- [20] H.U. Lee, Ch. Park, J.Y. Park. *RSC Adv.*, **6**, 2149 (2016). DOI: 10.1039/c5ra23791b
- [21] O.B. Mergen, E. Arda, G.A. Evingu. *J. Compos. Mater.*, **54** (11), 1497 (2019). DOI: 10.1177/0021998319883916
- [22] E. Dresvyanina, A. Yudenko, E. Maevskaya, V. Yudin, N. Yevlampieva, A. Gubarev, M. Slyusarenko, K. Heppe. *Vlak. Textil.*, **25** (2), 27 (2018).
- [23] N.V. Smirnova, K.A. Kolbe, E.N. Dresvyanina, S.F. Grebennikov, I.P. Dobrovolskaya, V.E. Yudin, Th. Luxbacher, P. Morganti. *Mater.*, **12** (11), 1874 (2019). <https://doi.org/10.3390/ma12111874>
- [24] T.V. Smotrina, E.N. Dresvyanina, S.F. Grebennikov, M.O. Kazakov, T.P. Maslennikova, I.P. Dobrovolskaya, V.E. Yudin. *Polymer*, **7** (2), 28 (2020). <https://doi.org/10.3390/cosmetics7020028>
- [25] K.A. Kolbe, A.M. Kamalov, E.G. Feklistov, N.V. Smirnova, V.V. Kodolova-Chukhontseva, E.N. Dresvyanina, I.P. Dobrovolskaya, G.V. Vaganov, V.E. Yudin. *J. Phys. Conf. Ser.*, **1695**, 012054 (2020). DOI:10.1088/1742-6596/1695/1/012054
- [26] N.A.H. Rosli, K.Sh. Loh, W.Y. Wong, R.M. Yunus, T.Kh. Lee, A. Ahmad, S.T. Chong. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (2), 632 (2020). DOI: 10.3390/ijms21020632
- [27] В.С. Баготский. *Основы электрохимии* (Химия, М., 1988), с. 400.
- [28] F.X. Hart. In: *The Physiology of Bioelectricity in Development, Tissue Regeneration and Cancer*, ed. by Ch.E. Pullar (CRC Press, 2018), p. 22. ISBN 9781138077836
- [29] I. Titushkin, M. Cho. *Biophys. J.*, **96** (2), 717 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.09.035>
- [30] I.A. Titushkin, V.S. Rao, M.R. Cho. *IEEE Tr. Plasma Sci.*, **32** (4), 1614 (2004). <https://doi.org/10.1109/TPS.2004.832625>