

УДК 577.352.2.085.2:678.743.22:539.21

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-4-152-162>

Для цитирования: Филиппова Е.О., Пичугин В.Ф., Хлусов И.А., Дзюман А.Н., Зайцев К.В., Гостюхина А.А. Поверхностные свойства и биосовместимость *in vitro* трековой мембраны на основе полиэтилентерефталата после комбинированного воздействия атмосферной низкотемпературной плазмы и ионизирующего γ -излучения радионуклида ^{60}Co . *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (4): 152–162.

Поверхностные свойства и биосовместимость *in vitro* трековой мембраны на основе полиэтилентерефталата после комбинированного воздействия атмосферной низкотемпературной плазмы и ионизирующего γ -излучения радионуклида ^{60}Co

Филиппова Е.О.^{1,2}, Пичугин В.Ф.¹, Хлусов И.А.^{2,4}, Дзюман А.Н.², Зайцев К.В.³, Гостюхина А.А.³

¹ Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

² Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

³ Сибирский федеральный научно-клинический центр ФМБА России (СибФНКЦ ФМБА России)
Россия, 636035, Томская область, г. Северск, ул. Мира, 4

⁴ Балтийский федеральный университет имени И. Канта (БФУ им. И. Канта)
Россия, 236041, г. Калининград, ул. А. Невского, 14

РЕЗЮМЕ

Цель. Исследование воздействия атмосферной низкотемпературной плазмы (АНП) и последующей стерилизации γ -лучами на топографию и свойства трековых мембран (ТМ) на основе полиэтилентерефталата (ПЭТФ).

Материалы и методы. ТМ были получены путем облучения пленки ПЭТФ потоком ионов $^{40}\text{Ar}^{+8}$ и последующего химического травления в 1,5N водном растворе NaOH. Для модификации поверхности на ТМ воздействовали АНП в течении 30 с. Стерилизация мембран проводилась с использованием γ -излучения радионуклида ^{60}Co в дозах 1 и 10 кГр (Si). Биосовместимость ТМ *in vitro* исследовали с использованием культуры пренатальных стромальных клеток (ПСКч), выделенной из легкого 11-недельного эмбриона человека и поддерживаемой *ex vivo*.

Результаты. Установлено, что обработка ТМ с помощью АНП приводит к возрастанию шероховатости и гидрофильности их поверхности ТМ. Изменение физико-химического состояния поверхности ТМ в результате воздействия холодной плазмы и последующей стерилизации практически не влияло на морфофункциональное состояние культуры ПСКч. Сделано заключение об относительной биоинертности ТМ и предложенных режимов их γ -стерилизации в отношении культуры стромальных клеток человека, перспективности дальнейших исследований в приложении материала к направлениям хирургической практики (кардиология, офтальмология).

Ключевые слова: стерилизация, стромальные клетки человека, морфофункциональная реакция.

✉ Филиппова Екатерина Олеговна, e-mail: katerinabosix@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря своей структуре и высокой биологической совместимости полиэтилентерефталат (ПЭТФ) перспективен для применения в офтальмологии [1–3], а также широко используется в кардиохирургии в качестве материала для протезирования сосудов [4]. Тем не менее существующие медицинские изделия из ПЭТФ далеки от совершенства. Современные технологии позволяют получать нанопористые пленки ПЭТФ (так называемые трековые мембраны, ТМ) [5], которые можно считать (в первом приближении) прототипом базальных мембран капилляров. Полная энергия поверхности ТМ из ПЭТФ составляет примерно 32 мДж/м² [6], поэтому степень его смачиваемости не всегда соответствует требованиям к имплантатам [7].

Атмосферная низкотемпературная плазма (АНП) является источником свободных радикалов, гидроксильных групп, атомов и ионов кислорода, кислородосодержащих молекул, заряженных частиц и фотонов, что может быть использовано для модификации поверхности полимерных материалов. Полезные свойства АНП – это малая глубина проникновения ее частиц в материал, способствующая изменению свойств только его поверхности без значительных тепловых эффектов [8–10]. При этом из работ [11, 12] известно, что модификация поверхности ряда органических материалов (ПЭТФ, полипропилен, непредельные каучуки) азотной плазмой сопровождается образованием на их поверхности азотсодержащих групп, повышающих смачиваемость и биосовместимость полимеров.

Среди методов стерилизации полимерных изделий медицинского назначения следует отметить стерилизацию ионизирующим излучением, широко применяемую в медицинской практике [13]. Тем не менее, несмотря на относительную безопасность γ -стерилизации, существует риск нарушения структуры тонких полимерных пленок с выделением токсичных мономеров этиленгликоля. Также отмечается изменение поверхностных и объемных свойств полимерных материалов при воздействии высокоэнергетического излучения и плазменной обработки [14].

Согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011, исследование *in vitro* биосовместимости клеточной культуры с модифицированными материалами биомедицинского назначения является одним из первых этапов тестирования рисков их применения [15].

Цель работы – исследование влияния поверхностных свойств ТМ на основе ПЭТФ после воз-

действия АНП и ионизирующего γ -излучения радионуклида ⁶⁰Со на морфофункциональную реакцию культуры пренатальных стромальных клеток человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ТМ были получены при облучении пленки ПЭТФ потоком тяжелых ионов ⁴⁰Ar⁸⁺ (максимальная энергия 41 МэВ) с последующей химической обработкой раствором NaOH при температуре травления 72–82 °С. Модификацию поверхности ТМ проводили в НИ ТПУ, согласно [16], с использованием экспериментальной установки для получения АНП на основе барьерного разряда. Время воздействия плазмы на каждую поверхность мембраны достигало 30 с.

ТМ стерилизовали γ -лучами радионуклида ⁶⁰Со в дозах 1 и 10 кГр (Si). В серии экспериментов γ -облучение проводилось до и после обработки АНП, что позволило оценить влияние последовательности воздействий на изменение основных характеристик исследуемых ТМ. ТМ после воздействия АНП хранились на воздухе, после воздействия γ -лучами – в специальных пакетах для стерилизации. Изображения ТМ получали с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), Hitachi S3400N Type II (Япония), и атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Топографию поверхности изучали на комплексном корреляторе спектральных, оптических и топографических свойств объектов Centaur HR (Россия). Шероховатость поверхности оценивали с помощью программного обеспечения Gwyddion.

Контактный угол смачивания поверхности ТМ (точность измерения $\pm 0,1^\circ$) измеряли на 1-, 3-, 7-, 14- и 21-е сут при помощи прибора KRUSS Easy Drop DSA 20 (Германия) при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ с применением деионизованной воды (θ_w^0) или глицерина (θ_g^0). Полную поверхностную энергию (σ_s), ее дисперсионную (σ_s^d) и полярную (σ_s^p) составляющие вычисляли по методу Оуэнса – Вендта – Рабел – Кэлби (ОВРК) [17]

$$\frac{\sigma_l \cdot (\cos\theta + 1)}{2\sqrt{\sigma_l^d}} = \frac{\sqrt{\sigma_l^p}}{\sqrt{\sigma_l^d}} \cdot \sqrt{\sigma_s^p} + \sqrt{\sigma_s^d} \quad (1)$$

Полярность мембран, как долю полярной компоненты в суммарной поверхностной энергии, определяли по формуле [18]:

$$p = \sigma_s^p / \sigma_s \quad (2)$$

Инфракрасные (ИК) спектры исходных, модифицированных и стерилизованных ТМ получали с помощью ИК-Фурье спектрометра Nicolet 5700 (США).

Культура клеток. Исследование *in vitro* биосовместимости ТМ проводили по методике, ранее описанной в работах [19, 20]. Для тестирования ТМ использовали поддерживаемую *ex vivo* линию FL-42 пренатальных стромальных клеток (ПСКч), первоначально выделенную из легкого 11-недельного эмбриона человека (ООО «Банк стволовых клеток», г. Томск). Клетки после размораживания сохраняют при пассажах стабильный карิโอтип и онкогенную безопасность, прилипают к пластиковой подложке, принимают фибробластоподобную морфологию и способны дифференцироваться в фибробласты или остеобласты [21]. Жизнеспособность клеток после размораживания, определяемая согласно ISO 10993-5 в тесте с 0,4%-м трипановым синим, составила 94%.

Модифицированные ТМ с линейными размерами 10×10 мм² помещали в лунки 24-луночных культуральных планшетов (Orange Scientific, Бельгия). ТМ занимали 60% площади поверхности лунок. В каждой группе было по три матрикса. Контрольной группой считалась культура ПСКч на пластиковой поверхности культуральных планшетов без добавления ТМ. В лунки добавляли по 1 мл безклеточной культуральной среды либо 3×10^4 жизнеспособных ПСКч в 1 мл культуральной среды следующего состава (Sigma, США): 80% среды ДМЕМ/F12 (1 : 1), 20% сыворотки крови эмбрионов коров, 280 мг/л L-глутамин, 50 мг/л гентамицин.

Через 72 ч культивирования при температуре 37 °С и влажности 100% ТМ удаляли пинцетом, собирали надосадочную часть (супернатанты) клеточных культур с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 500 g. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ), концентрацию общего и свободного кальция, неорганического фосфата и калия в межклеточной жидкости выявляли на биохимическом анализаторе Konelab60i (США) с применением стандартного фотометрического метода при помощи специализированных наборов Thermo Fisher Scientific Inc. (США).

Планшеты сушили в течение 24 ч на воздухе при комнатной температуре. Клетки, адгезированные в пластиковой поверхности планшетов вокруг ТМ, фиксировали параами формалина в течение 30 с для проведения иммуноцитохимической (ИЦХ) окраски на виментин. Для окраски клетки фиксировали и пермеабилитаровали в холодном (-20 °С) метаноле в течение 1 мин. ИЦХ исследо-

вание осуществляли с использованием мышинных моноклональных антител к человеческому виментину (clone V9, NovocastraTM, Великобритания) при разведении 1 : 500. Визуализацию проводили с помощью набора NovolinkTM Polymer Detection Systems (Великобритания) на основе рекомендованного производителем иммунопероксидазного метода. Меткой иммунной реакции (специфическая коричневая окраска участков в цитоплазме клеток) служил 3,3-диаминобензидин (DAB). ИЦХ манипуляции на ТМ не проводили вследствие их недостаточной оптической прозрачности, не позволившей зафиксировать слабые изменения в окраске цитоскелета.

Статистический анализ. Результаты обрабатывали с применением программы Statistica 10.0 с расчетом следующих параметров распределений: для физических параметров – величины среднего значения M , стандартного отклонения SD , ошибки среднего m , для биологических параметров – медианы, 25- и 75-го квартилей $Me (Q_1-Q_3)$. Оценка статистической значимости различий проводилась с применением параметрического t-критерия Стьюдента (P_t) или непараметрического критерия Манна – Уитни (U -тест, P_U). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно СЭМ (рис. 1), субмикронные поры (средний диаметр 0,5 мкм) на поверхности ТМ расположены относительно равномерно с высокой плотностью распределения (5×10^8 пор/см² поверхности). На поверхности мембраны имеются дефекты неправильной формы, полученные в результате γ -облучения, которые определяются на СЭМ (рис. 1, с, указано стрелкой) и изображениях АСМ (рис. 2).

Относительная площадь (%) дефектных зон ТМ, рассчитанная как отношение площади дефектных элементов к общей площади исследуемой области и представленная в табл. 1, не зависела от дозы облучения. Статистически значимых различий дефектов ТМ при облучении дозами 1 и 10 кГр не обнаружено ($p > 0,05$).

Обработка АНП в отличие от γ -стерилизации приводила к значительному (более чем в 4 раза) увеличению индекса шероховатости Ra по сравнению с исходными образцами (табл. 2). В свою очередь, комбинация АНП + γ -стерилизация практически нивелировала нежелательный эффект плазменной обработки на рельеф ТМ поверхности.

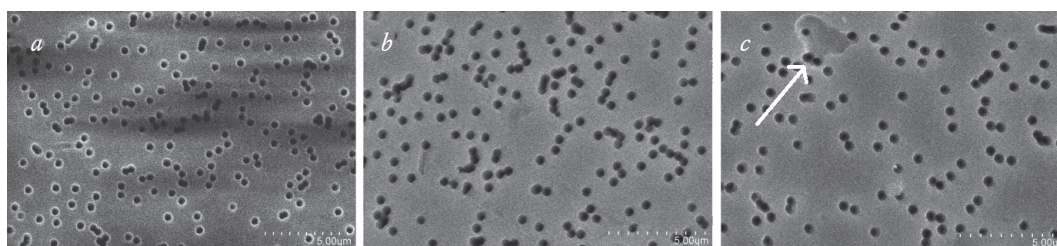


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение поверхности исходной ТМ (а), ТМ после плазменной модификации (b) и после стерилизации дозой 1 кГр (c)

Fig. 1. Electron microscopic image of the surface of the original TM (a), TM after plasma modification (b) and after sterilization with a dose of 1 kGy (c)

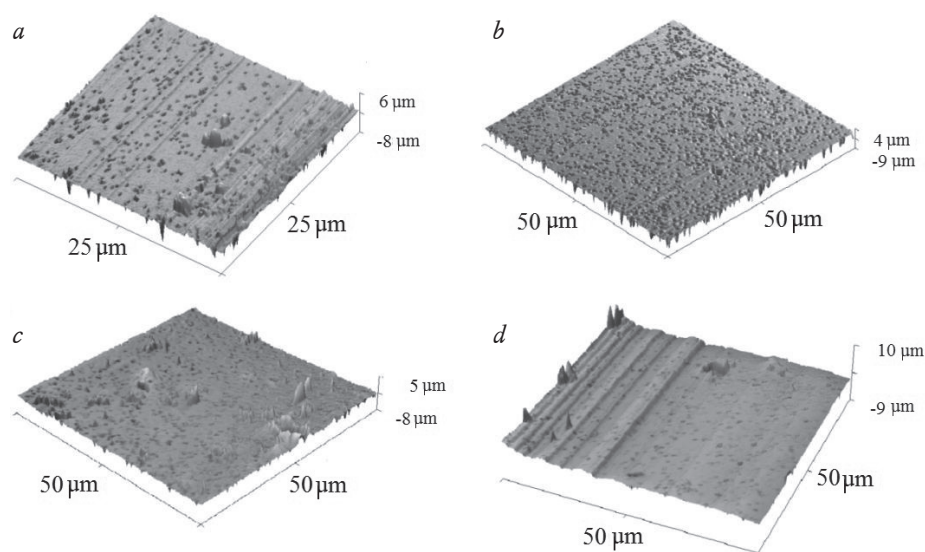


Рис. 2. Топография поверхности исходных ТМ (а), после плазменной модификации (b), после стерилизации (1 кГр) исходных (c) и плазменно модифицированных ТМ (d)

Fig. 2. Surface topography of original TM (a), after plasma modification (b), after sterilization (1 kGy) of source (c) and plasma-modified TM (d)

Т а б л и ц а 1
T a b l e 1

Относительная площадь (%) и глубина дефектов ТМ после γ -стерилизации модифицированных и не модифицированных плазмой образцов, $M \pm m$				
Relative area (%) and depth of defects of TM after γ -sterilization of modified and not modified by plasma samples, $M \pm m$				
Доза стерилизации, кГр Sterilization dose, kGy	Без плазменной обработки Without plasma treatment		Обработка поверхности плазмой Plasma treatment	
	Относительная площадь дефектов, % Relative area of defects, %	Глубина дефекта, мкм Depth of defects, μm	Относительная площадь дефектов, % Relative area of defects, %	Глубина дефекта, мкм Depth of defects, μm
1	$7,9 \pm 0,9$	$4,25 \pm 1,1$	$8,1 \pm 0,4$ $p > 0,47$	$4,06 \pm 2,8$ $p > 0,51$
10	$6,1 \pm 1,3$	$3,87 \pm 2,3$	$8,1 \pm 0,9$ $p > 0,32$	$4,11 \pm 0,7$ $p > 0,18$

П р и м е ч а н и е: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с необработанными плазмой стерилизованными образцами.

N o t e: p – the level of statistical significance of differences compared to untreated plasma sterilized samples.

Т а б л и ц а 2
T a b l e 2

Образец Sample	R_a^*	σ_s	σ_s^d	σ_s^p	Полярность Polarity	θ_w^{0*}	θ_g^{0*}
Пленка ПЭТФ PET film	0,002	36,76	29,15	7,61	0,2	61,1	76,5
ТМ исходная TM naive	0,031	29,95	5,97	23,98	0,8	72,8	74,8
ТМ + 1 кГр TM + 1 kGy	0,028	43,73	0,30	43,43	0,99	68,7	77,2
ТМ + 10 кГр γ TM + 10 kGy γ	0,03	37	0,9	36,34	0,98	72,3	80,9
ТМ + pl 30	0,103	131,53	7,33	124,21	0,94	33,0	73,3
ТМ + pl 30 + 1 кГр TM + pl 30 + 1 kGy	0,055	110,3	3,1	107,2	0,97	36,0	70,5
ТМ + pl 30 + 10 кГр TM + pl 30 + 10 kGy	0,055	120,1	7,08	113,02	0,94	39,1	76,9

П р и м е ч а н и е: pl – обработка плазмой; параметр шероховатости $\dim R_a = \text{мкм}$; поверхностная энергия $\dim \sigma = \text{мДж/м}^2$; контактный угол $\dim \theta = \text{градус } (^\circ)$. * средние величины трех измерений.

N o t e: pl – plasma treatment; roughness parameter $\dim R_a = \text{мкм}$; surface energy $\dim \sigma = \text{мJ/м}^2$; contact angle $\dim \theta = \text{degree } (^\circ)$. * the data given are average values.

Согласно данным табл. 2, исходная ТМ обладает слабо выраженной гидрофильностью со средним значением краевого угла $\theta = 72,8^\circ$. АНП значительно увеличивала гидрофильность поверхности ТМ ($\theta = 33^\circ$). При этом отмечался некоторый рост величины краевого угла (на $5-7^\circ$) в течение первых 3 сут хранения с относительной стабильностью в последующие дни (рис. 3).

γ -Излучение изотопа ^{60}Co практически не действовало на смачиваемость исходной ТМ (см. табл. 2), однако на фоне АНП ухудшало на $3-6^\circ$ ее гидрофильность.

В первые 3 сут хранения после комбинированного воздействия АНП + γ -стерилизация наблюдался рост контактного угла смачивания на $10-12^\circ$ (см. рис. 3).

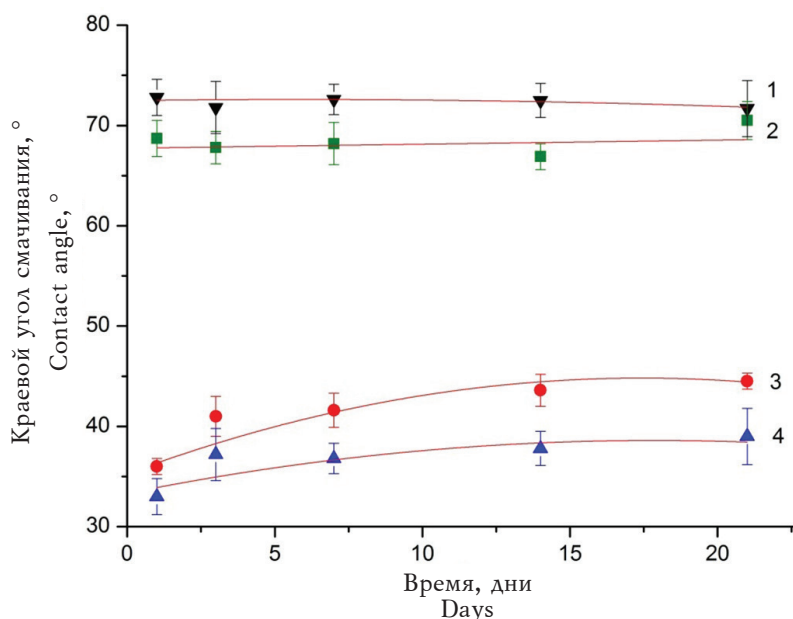


Рис. 3. Зависимость величины краевого угла смачивания θ_w^0 от времени хранения: 1 – исходная ТМ; 2 – после γ -стерилизации в дозе 1 кГр; 3 – после плазменной обработки и γ -стерилизации в дозе 1 кГр; 4 – после плазменной обработки

Fig. 3. Dependence of the value of contact angle of wetting θ_w^0 on storage time: 1 – virgin TM; 2 – after γ -sterilization in a dose of 1 kGy; 3 – after plasma treatment and γ -sterilization in a dose of 1 kGy; 4 – after plasma treatment

Изготовление ТМ из пленки ПЭТФ существенно повышает (с 0,2 до 0,8) значение полярности ее поверхности (см. табл. 2). Дополнительные манипуляции с АНП или γ -стерилизацией увеличивают долю полярной составляющей σ_p . Однако сочетание АНП + γ -стерилизация не способствовало вполне ожидаемому росту полярности ТМ.

Полученные данные согласуются с результатами ИК-спектроскопии ТМ. После воздействия АНП имело место уменьшение полос поглощения 1 712, 1 241 и 1 093 см^{-1} , которые интерпретируют как колебания неполярных (C=C, C=O) функциональных групп, в большей мере ориентированных в приповерхностном слое материала. Предположительно, АНП способствует деструкции полимерных цепей и разрыву связей C-O и C-C в аморфных сайтах поверхности ТМ, что приводит к образованию в местах разрыва карбоксильных групп (COOH) и предопределяет увеличение шероховатости и гидрофильности ТМ.

В свою очередь, стерилизация γ -облучением ^{60}Co АНП-модифицированных мембран снижала интенсивность полосы поглощения 1 716 см^{-1}

в ИК-спектрах, что предполагает уменьшение концентрации полярных функциональных групп в приповерхностном слое мембраны, и, соответственно, сопровождается уменьшением гидрофильности поверхности, отмеченной в табл. 2.

Биосовместимость трековых мембран in vitro. Физико-химическая трансформация поверхности ТМ в результате воздействия АНП обусловила необходимость изучения *in vitro* морфофункциональной реакции ПСКч. Известной проблемой полимерных медицинских материалов и изделий является избыточное раздражение клеток соединительной ткани, часто приводящее к формированию гигантских многоядерных клеток инородных тел и фиброзной капсулы вокруг полимерных имплантатов [22–26], необходимости их извлечения вследствие «неуспеха» их кардиологического и офтальмологического приложения.

Результаты тестирования реакции ПСКч показали слабую, сравнимую с контролем, экспрессию виментина как внутриклеточного маркера фибробластов [27] в единичных клетках, расположенных вокруг ТМ (рис. 4).

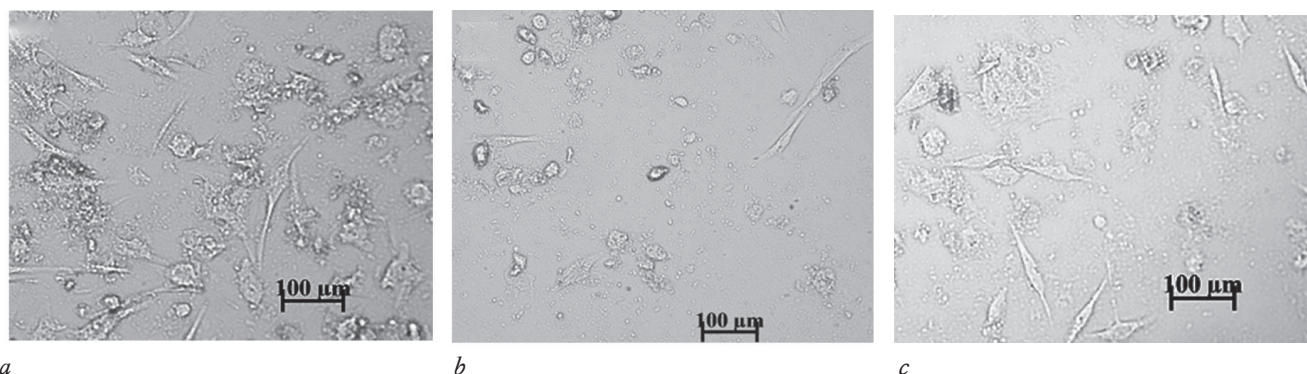


Рис. 4. Состояние 3-суточной культуры фибробластоподобных пренатальных стромальных клеток, выделенных из легких человека, в условиях сокультивирования с тестируемыми ТМ. Окраска на виментин (участки клеток коричневого цвета): *a* – контроль роста клеток; *b* – ТМ после стерилизации ^{60}Co ; *c* – ТМ после обработки АНП и последующей стерилизации ^{60}Co

Fig. 4. Status of a 3-day culture of fibroblast-like prenatal stromal cells isolated from the human lungs under conditions of co-cultivation with the test materials. Coloring on vimentin (sections of cells of brown color). *a* – control of cell growth; *b* – ТМ after sterilization of ^{60}Co ; *c* – ТМ after treatment with cold plasma followed by sterilization

По-видимому, потенциальные продукты деструкции ТМ после высокоэнергетических воздействий не имеют значения для созревания и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в клетки соединительной ткани, что исключает риск избыточной фиброваскулярной пролиферативной реакции на модифицированные ТМ.

Сорбция различных ионов (прежде всего Ca^{2+}) на поверхности медицинских изделий является также нежелательным явлением для мягких тка-

ней [19], так как это может приводить к нарушению характеристик материала, особенно его оптических свойств. Неорганический фосфор и кальций являются субстратом ЩФ для формирования и отложения фосфатов кальция остеогенными клетками на полимерных поверхностях [19]. В связи с этим активность ЩФ и колебания уровня кальция и фосфора в биологических средах *in vitro* рассматриваются в качестве маркеров остеогенного направления развития МСК [19].

Минеральный и биохимический состав супернатантов 3-суточной культуры пренатальных стромальных клеток легкого человека (контроль роста) при прямом контакте с модельными мембранами после различной обработки их поверхности, $Me (Q_1-Q_3)$							
Mineral and biochemical composition of supernatants of a 3-day culture of prenatal stromal cells of the human lung (growth control) with direct contact with model membranes after different treatment of their surface, $Me (Q_1-Q_3)$							
№ группы № group	Исследуемая группа Study group	pH	Кальций ионизированный, мМ Ionized calcium, mM	Кальций общий, мМ Calcium total, mM	Фосфат-ионы, мМ Phosphate-ions, mM	Калий ионизированный, мМ Ionized potassium, mM	ЩФ, Ед/л Alkaline phosphatase, U/l
Контрольная культура без ТМ Control culture without TM							
1	Полная культуральная среда (ПКС), $n = 4$ Full culture medium (FCM), $n = 4$	9,00 (8,89–9,12)	1,15 (0,96–1,17)	1,64 (1,25–1,68)	0,78 (0,73–0,80)	5,85 (5,7–5,95)	22 (19,5–24,5)
2	Контроль роста фибробластоподобных клеток на пластике, $n = 4$ Control of the growth of fibroblast-like cells on plastics, $n = 4$	8,86 (8,78–9,01)	1,21 (0,95–1,24)	1,58 (1,11–1,61)	0,73 (0,67–0,77)	5,70 (5,25–5,95)	44,5* (41,5–47) $p_1 < 0,00012$
ТМ после стерилизации ^{60}Co в дозе 10 кГр TM after sterilization ^{60}Co in a dose 10 kGry							
3	ТМ в ПКС без клеток, $n = 3$ TM in FCM without cells, $n = 3$	8,88 (8,85–8,88)	1,18	1,33 (1,27–1,36)	0,69	6,1* $p_3 < 0,05$	18 (15–22)
4	ТМ в контакте с клетками, $n = 3$ TM in contact with cells, $n = 3$	9,03* (9,03–9,04) $p_3 < 0,05$	1,17	1,62 (1,59–1,64)	0,77 (0,76–0,77)	6,0* $p_3 < 0,05$	45* (45–47) $p_3 < 0,05$
ТМ после обработки АНП с последующей стерилизацией ^{60}Co в дозе 10 кГр TM after cold plasma treatment followed by sterilization Co^{60} in a dose 10 kGry							
5	ТМ в ПКС без клеток, $n = 3$ TM in FCM without cells, $n = 3$	9,15* (9,13–9,15) $p_3 < 0,05$	1,18 (1,17–1,18)	1,27 (1,25–1,27)	0,65* (0,65–0,67) $p_1 < 0,02$ $p_3 < 0,05$	6,1* $p_1 < 0,05$	17* (16–18) $p_1 < 0,04$
6	ТМ в контакте с клетками, $n = 3$ TM in contact with cells, $n = 3$	9,09* (9,09–9,10) $p_4 < 0,05$	1,13* (1,12–1,13) $p_4 < 0,05$ $p_5 < 0,05$	1,53 (1,52–1,82)	0,76 (0,73–0,77)	6,0* $p_5 < 0,05$	42* (42–44) $p_4 < 0,05$ $p_5 < 0,05$

Примечание: n – количество исследованных образцов (лунок) в планшете.

* статистически значимые различия согласно U-критерию Манна – Уитни.

Note: n – number of samples (wells) in the plate.

* statistically significant differences according to the U test Mann – Whitney.

Согласно полученным результатам (см. табл. 3), при 3-суточном культивировании в ПКС без остеогенных добавок контрольная культура ПСКч вне контакта с ТМ (группа 2 в табл. 3) не вызывала ионных изменений состава ПКС, но секретировала ЩФ в межклеточную жидкость.

АНП и последующая γ -стерилизация ^{60}Co в дозе 10 кГр придавала ТМ способность менять ионный

состав окружающей среды, что может быть показателем как изменения состояния мембранной поверхности, так и появления продуктов деструкции ТМ, небезразличных для клеток. Вероятно, это является отражением изменений физико-химических свойств модифицированных ТМ (изменение заряда, увеличение шероховатости и гидрофильности), отмеченных выше. ПСКч способны

активно менять ионный состав культуральной среды [28]. При этом увеличение концентрации в межклеточной жидкости калия, преимущественно располагающегося внутриклеточно, является показателем цитотоксичности, обусловленной нарушением мембранных каналов и насосов [29].

Тем не менее морфологическое и метаболическое состояние клеточной культуры при контакте с ТМ, модифицированной как одной γ -стерилизацией, так и в комбинации с АНП, статистически значимо не отличалось от такового в контрольной группе клеток на пластиковой поверхности культуральных планшетов (см. табл. 3). Это обстоятельство позволяет исключить существенную деструкцию ТМ после стерилизации. Изменение физико-химического состояния поверхности ТМ после модификации остается, по-видимому, в пределах относительной биоинертности, поскольку не приводит к грубым изменениям морфофункционального состояния культуры ПСКЧ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплекс проведенных исследований позволяет сделать следующие выводы.

1. Воздействие АНП на поверхность ТМ способствует более чем 4-кратному увеличению параметра шероховатости R_a . Последующая γ -стерилизация ТМ, модифицированных плазмой, практически нивелирует изменение их шероховатости, вызванное R_a .

2. Обработка ТМ с помощью АНП приводит к возрастанию гидрофильности поверхности с соответствующим уменьшением значений контактного угла θ на 40–43°. Стерилизация существенно не влияет на смачиваемость поверхности исходных и плазменно модифицированных ТМ.

3. Увеличение смачиваемости и шероховатости поверхности ТМ, обусловленное их плазменной обработкой, связано, по-видимому, с деструкцией полимерных цепей, находящихся в аморфной фазе, и формированием в местах разрыва С–О и С–С карбоксильных групп.

4. Слабая морфофункциональная реакция культуры пренатальных стромальных клеток человека на 3-суточный контакт с модифицированными ТМ свидетельствует о сохранении их относительной биоинертности, отсутствии выраженной деструкции при воздействии ионизирующего γ -излучения радионуклида ^{60}Co в дозе 1–10 кГр, в том числе комбинированного с АНП.

Таким образом, поверхностные свойства и биосовместимость ТМ на основе ПЭТФ после воздействия АНП и ионизирующего γ -излучения

радионуклида ^{60}Co свидетельствуют о перспективности дальнейшего их изучения в приложении к кардиохирургии, офтальмологии и, возможно, других разделов медицины.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Филиппова Е.О., Хлусов И.А. – проведение исследований, анализ полученного материала, написание статьи. Пичугин В.Ф. – анализ полученного материала, написание статьи. Дзюман А.Н. – окрашивание препаратов на виментин. Зайцев К.В., Гостюхина А.А. – проведение исследований *in vitro*.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00048.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Филиппова Е.О., Кривошеина О.И., Запускалов И.В. Интрастромальная имплантация трековых полимерных мембран в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы. *Медицинский Вестник Башкортостана*. 2015; 10 (2): 137–139. [Filippova E.O., Krivosheina O.I., Zapuskalov I.V. Intrastromal implantation of track polymeric membranes in the treatment of endothelial-epithelial dystrophy of the cornea. *Medical Bulletin of Bashkortostan*. 2015; 10 (2): 137–139 (in Russ.)].
2. Филиппова Е.О., Сохорева В.В., Пичугин В.Ф. Исследование возможности применения ядерных трековых мембран для офтальмологии. *Мембраны и мембранные технологии*. 2014; 4 (4): 267–271. [Filippova E.O., Sokhoreva V.V., Pichugin V.F. Investigation of the possibility of using nuclear track membranes for ophthalmology. *Membranes and Membrane Technologies*. 2014; 4 (4): 267–271 (in Russ.)].
3. Filippova E.O., Pichugin V.F., Sokhoreva V.V. Potential use of nuclear track membranes in ophthalmology. *Petroleum Chemistry*. 2015; 54 (8): 669–672. DOI: 10.1134/S0965544114080039.
4. Lam M.T., Wu. J.C. Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration. *EXPERT REV CARDIOVASC THER*. 2012; 10 (8): 1039–1049.
5. Apel P.Yu. Tracks of very heavy ions in polymers. *Nucl. Instrum. Meth. in Phys. Res.* 1997; B130: 55–63.
6. Миронюк А.В., Придатко А.В., Сиволапов П.В., Свидацкий В.А. Особенности оценки смачивания полимерных поверхностей. *Технологии органических и неорганических веществ. Восточно-Европейский журнал передовых технологий*. 2014; 1/6: 23–26. [Mironyuk A.V.,

- Pridatko A.V., Sivolapov P.V., Svidersky V.A. Features of evaluation of wetting polymer surfaces. Technologies of organic and inorganic substances. *Eastern European Journal of Advanced Technology*. 2014; 1/6: 23–26 (in Russ.).
7. Филиппова Е.О., Сохорева В.В., Шилова О.Г. Исследование возможности применения полимерных трековых мембран в барьерной кератопластике. *Известия высших учебных заведений. физика*. 2013; 56 (11/3): 303–305. [Filippova E.O., Sokhoreva V.V., Shilova O.G. Investigation of the possibility of using polymeric track membranes in barrier keratoplasty. *News of Higher Educational Institutions. Physics*. 2013; 56 (11/3): 303–305 (in Russ.).]
 8. Dmitriev S.N., Kravets L.I., Sleptsov V.V., Elinson V.M. Water permeability of poly(ethylene) terephthalate track membranes modified in plasma. *Desalination*. 2002; 146: 279–286.
 9. Фортова В.Е. Энциклопедия низкотемпературной плазмы. Вводный том IV. М.: Наука, 2000: 505. [Fortova V.E. Encyclopedia of low-temperature plasma. Introductory volume IV. Moscow: Science Publ., 2000: 386 (in Russ.).]
 10. Провоторова Д.А. Модификация непредельных каучуков в низкотемпературной плазме с целью улучшения их адгезионных свойств. *Клеи. Герметики. Технологии*. 2013; 9: 6–8. [Provotorova D.A. Modification of unsaturated rubbers in low-temperature plasmas in order to improve their adhesion properties. *Adhesives. Sealants. Technologies*. 2013; 9: 6–8 (in Russ.).]
 11. Головятинский С.А. Модификация поверхности полимеров импульсной плазмой атмосферного давления. *Вестник Харьковского университета*. 2004; 628: 80–86. [Golovyatinsky S.A. Modification of polymer surfaces by pulsed plasma of atmospheric pressure. *Bulletin of Kharkov University*. 2004; 62: 80–86 (in Russ.).]
 12. Акишев Ю.С. Экспериментальные и теоретические исследования воздействия неравновесной низкотемпературной плазмы атмосферного давления на поверхность полимерных пленок. *5-й Международный симпозиум по теоретической и прикладной плазменной химии: материалы симпозиума*. Иваново. 2008: 360–363. [Akishev Yu.S. Experimental and theoretical studies of the effect of a non-equilibrium low-temperature plasma of atmospheric pressure on the surface of polymer films. *5th International Symposium on Theoretical and Applied Plasma Chemistry: symposium materials*. Ivanovo, 2008: 360–363 (in Russ.).]
 13. ГОСТ Р ИСО 11137 – 2000. Стерилизация медицинской продукции. Требования к валидации и текущему контролю. Радиационная стерилизация. [GOST R ISO 11137 – 2000. Sterilization of medical products. Requirements for validation and ongoing monitoring. Radiation sterilization (in Russ.).]
 14. Filippova E.O. Influence of low-temperature plasma and γ -radiation on the surface properties of PET track membranes. *Inorganic Materials: Applied Research*. 2016; 7 (5): 664–672.
 15. ГОСТ ISO 10993-5-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*. М.: Стандартинформ, 2014. [GOST ISO 10993-5-2011 Medical products. Evaluation of biological effects of medical devices. Part 5. Studies on cytotoxicity: invitromethods, Moscow: 2014 (in Russ.).]
 16. Филиппова Е.О., Каланда Н.С., Пичугин В.Ф. и др. Исследование процесса стерилизации трековых мембран из полиэтилентерефталата с помощью низкотемпературной атмосферной плазмы. *Медицинская техника*. 2017; 2 (302): 26–29. [Filippova E.O., Kalanda N.S., Pichugin V.F. Investigation of the process of sterilization of track membranes from polyethylene terephthalate using low-temperature atmospheric plasma. *Medical Equipment*. 2017; 2: 26–29 (in Russ.).]
 17. Carre A. Polar interactions at liquid/polymer inter faces. *Adhesion Sci. Technol*. 2007; 21 (10): 961–981.
 18. Кузнецов В.Д. Поверхностная энергия твердых тел. М.: Государственное издательство технико-теоретической литературы. 1954: 220. [Kuznetsov V.D. Surface energy of solids. M.: State Publishing House of Technical and Theoretical Literature. Moscow: 1954: 220 (in Russ.).]
 19. Khlusov I.A., Khlusova M.Yu., Zaitsev K.V. Pilot *in vitro* study of the parameters of artificial niche for osteogenic differentiation of human stromal stem cell pool. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2011; 150 (4): 535–542.
 20. Bolbasov E.N., Anissimov Y.G., Pustovoytov A.V. et al. Ferroelectric polymer scaffolds based on a copolymer of tetrafluoroethylene with vinylidene fluoride: Fabrication and properties. *Materials Science and Engineering: C*. 2014; 40: 32–41. DOI: 10.1016/j.msec.2014.03.038.
 21. Khlusov I.A., Shevtsova N.M., Khlusova M.Y. Detection *in vitro* and quantitative estimation of artificial microterritories which promote osteogenic differentiation and maturation of stromal stem cells. *Methods Mol. Biol*. 2013; 1035: 103–119. DOI: 10.1007/978-1-62703-508-8_9.
 22. Гужова А.А. и др. Влияние параметров электретирования на поверхностные и электретные свойства полиэтилентерефталата. *Известия Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена*. 2013; 157: 55–60. [Guzhova A.A. et al. Influence of the parameters of the electret on the surface and electret properties of polyethylene terephthalate. *News of the Russian State Pedagogical University. A.I. Herzen*. 2013; 157: 55–60 (in Russ.).]
 23. Dowling D.P. Atmospheric Pressure Plasma Treatment of Amorphous Polyethylene Terephthalate for Enhanced Heat sealing Properties. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2013; 35: 1–8.
 24. Kwang-Hyuk Ch. Effect of ar mon beam pre-treatment of poly(ethylene terephthalate) substrate on the mechanical and electrical stability of flexible InSnO films grown by roll-to-roll sputtering system. *Japanese Journal of Applied Physics*. 2013; 52: 45–49.

25. Navaneetha K. Adhesive properties of polypropylene (PP) and polyethylene-terephthalate (PET) film surfaces treated by DC glow discharge plasma. *Vacuum* 83. 2009; 332–339.
26. Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J. Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine. Third ed. Elsevier Academic Press: Oxford, UK; Waltham, MA. 2013: 1520.
27. Eriksson J.E., Dechat T., Grin B., Helfand B. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009; 119 (7): 1763–1771. DOI: 10.1172/JCI38339.
28. Хлусов И.А., Хлусова М.Ю., Шевцова Н.М. Морфофункциональное состояние культуры стволовых клеток на 2D-матрикса, имитирующем «молчание» остеогенные и кроветворные микротерритории. *Бюллетень сибирской медицины*. 2012; 6: 96–105. [Khlusov I.A., Khlusova M.Yu., Shevtsova N.M. Morphofunctional state of stem cell culture on 2D matrix, imitating “silent” osteogenic and hematopoietic microterritories. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2012; 6: 96–105 (in Russ.)].
29. Ляхов Н.З. Биоконпозиты на основе кальций-фосфатных покрытий, наноструктурных и ультрамелкозернистых биоинертных металлов, их биосовместимость и биодegradация. Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2014: 595. [Lyakhov N.Z. Biocomposites based on calcium phosphate coatings, nanostructured and ultrafine-grained bioinert metals, their biocompatibility and biodegradation. Tomsk: Tomsk State University Publishing House, 2014: 596 (in Russ.)].

Поступила в редакцию 24.08.2018

Подписана в печать 09.11.2018

Филиппова Екатерина Олеговна, канд. техн. наук, инженер, НИ ТПУ; ассистент, кафедра офтальмологии, гистологии, цитологии и эмбриологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 000-0003-0425-1213.

Пичугин Владимир Федорович, д-р физ.-мат. наук, профессор, НИ ТПУ, г. Томск.

Хлусов Игорь Альбертович, д-р мед. наук, профессор, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ; профессор-исследователь, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0003-3465-8452.

Дзюман Анна Николаевна, канд. мед. наук, доцент, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-0795-0987.

Зайцев Константин Васильевич, канд. мед. наук, руководитель экспериментальной лаборатории биомедицинских технологий, Филиал «Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии», СибФНКЦ ФМБА России г. Томск. ORCID iD 0000-0003-6504-5232.

Гостюхина Алена Анатольевна, науч. сотрудник, экспериментальная лаборатория биомедицинских технологий, Филиал «Томский научно-исследовательский институт курортологии и физиотерапии», СибФНКЦ ФМБА России г. Томск. ORCID iD 0000-0003-3655-6505.

✉ Филиппова Екатерина Олеговна, e-mail: katerinabosix@mail.ru.

УДК 577.352.2.085.2:678.743.22:539.21

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-4-152-162>

For citation: Filippova E.O., Pichugin V.F., Khlusov I.A., Dzyuman A.N., Zaitsev K.V., Gostyukhina A.A. Surface properties and *in vitro* biocompatibility of a track membrane based on polyethylene terephthalate after exposure to low-temperature atmospheric plasma and ionizing γ -radionuclide ^{60}Co . *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (2): 152–162.

Surface properties and *in vitro* biocompatibility of a track membrane based on polyethylene terephthalate after exposure to low-temperature atmospheric plasma and ionizing γ -radionuclide ^{60}Co

Filippova E.O.^{1,2}, Pichugin V.F.¹, Khlusov I.A.^{2,4}, Dzyuman A.N.², Zaitsev K.V.³, Gostyukhina A.A.³

¹ National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU)
30, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

² Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

³ *Federal Siberian Research Clinical Center FMBA of Russia*
4, Mira Str., Seversk, 636035, Tomsk Region, Russian Federation

⁴ *Immanuel Kant Baltic Federal University*
14, A. Nevskii Str., 236041, Kaliningrad, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. This research studies the effect of a low-temperature atmospheric plasma and the subsequent γ -ray sterilization on topography and properties of track membranes (TM) based on polyethylene terephthalate (PET).

Materials and methods. TM were obtained by irradiating a PET film with a $^{40}\text{Ar}^{+8}$ ion beam and then by chemical etching in an aqueous solution of 1.5N NaOH. Modification of the membrane surface was carried out by exposure to an atmospheric low-temperature plasma. The gamma radiation of the radionuclide ^{60}Co with the dosages of 1kGy (SI) and 10 kGy (SI) was used to sterilize the membranes. *In vitro* studies of the TM biocompatibility were performed by using a culture of prenatal stromal cells isolated from a lung of an 11-week human embryo and maintained *ex vivo*.

Results. It has been established that the treatment of the membranes with the low-temperature atmospheric plasma leads to an increase in the roughness and hydrophilization of the TM surface. The change in the physical-chemical state of the TM surface as a result of the exposure of cold plasma and subsequent sterilization had practically no effect on the morphofunctional state of the culture of human prenatal stromal cells. *In vitro* tests on the TM cellular-molecular biocompatibility with a short-term culture of *in vitro* fibroblast-like cells have made it possible to indicate their relative bioinerticity with respect to human stromal cells. The conclusion is made about the relative bioinerticity of TM and the proposed regimes for their sterilization with respect to the culture of human stromal cells, the prospects for further research in applying the material to the areas of surgical practice (cardiology, ophthalmology).

Key words: track membranes, polyethylene terephthalate, human stromal cells, biocompatibility, atmospheric low-temperature plasma, sterilization, morphofunctional reaction.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research as a part of the research project No. 18-315-00048.

Received 24.08.2018
Accepted 09.11.2018

Filippova Ekaterina O., PhD, NR TPU, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0425-1213.

Pichugin Vladimir F., DPhMSc, Professor, NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

Khlyusov Igor A., DM, Professor, SSMU, Tomsk; Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3465-8452.

Dzuman Anna N., PhD, Assistant Professor, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-0795-0987.

Zaytsev Konstantin V., PhD, Siberian Federal Scientific and Clinical Center, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-6504-5232.

Gostyukhina Alena A., Researcher, Siberian Federal Scientific and Clinical Center, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3655-6505.

(✉) Filippova Ekaterina O., e-mail: katerinabosix@mail.ru.