

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 полиэтилентерепфталата после комбинированного воздействия атмосферной низкотемпературной плазмы и ионизирующего  $\gamma$ -излучения радионуклида  $^{60}\text{Co}$ . *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (4): 152–162.

## Поверхностные свойства и биосовместимость *in vitro* трековой мембраны на основе полиэтилентерепфталата после комбинированного воздействия атмосферной низкотемпературной плазмы и ионизирующего $\gamma$ -излучения радионуклида $^{60}\text{Co}$

Филиппова Е.О.<sup>1,2</sup>, Пичугин В.Ф.<sup>1</sup>, Хлусов И.А.<sup>2,4</sup>, Дзюман А.Н.<sup>2</sup>, Зайцев К.В.<sup>3</sup>, Гостюхина А.А.<sup>3</sup>

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

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

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

<sup>4</sup> 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  $\gamma$ -лучами на топографию и свойства трековых мембран (ТМ) на основе полиэтилентерепфталата (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  $\gamma$ -излучения радионуклида  $^{60}\text{Co}$  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  $\gamma$ -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.

## 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/м<sup>2</sup> [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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -излучения радионуклида <sup>60</sup>Со на морфофункциональную реакцию культуры пренатальных стромальных клеток человека.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ТМ были получены при облучении пленки ПЭТФ потоком тяжелых ионов <sup>40</sup>Ar<sup>8+</sup> (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  $\gamma$ -лучами радионуклида <sup>60</sup>Со в дозах 1 и 10 кГр (Si). В серии экспериментов  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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 ( $\theta_w^0$ ) или глицерина ( $\theta_g^0$ ). Полную поверхностную энергию ( $\sigma_s$ ), ее дисперсионную ( $\sigma_s^d$ ) и полярную ( $\sigma_s^p$ ) 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  $10 \times 10$  мм<sup>2</sup> 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  $3 \times 10^4$  жизнеспособных ПСКч в 1 мл культуральной среды следующего состава (Sigma, США): 80% среды DMEM/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 парами формалина в течение 30 с для проведения иммуноцитохимической (ИЦХ) окраски на виментин. Для окраски клетки фиксировали и пермеабилizировали в холодном (–20 °С) метаноле в течение 1 мин. ИЦХ исследо-

вание осуществляли с использованием мышиных моноклональных антител к человеческому виментину (clone V9, Novocastra™, Великобритания) при разведении 1 : 500. Визуализацию проводили с помощью набора Novolink™ 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 ( $5 \times 10^8$  пор/см<sup>2</sup> поверхности). На поверхности мембраны имеются дефекты неправильной формы, полученные в результате  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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 +  $\gamma$ -стерилизация практически нивелировала нежелательный эффект плазменной обработки на рельеф ТМ поверхности.

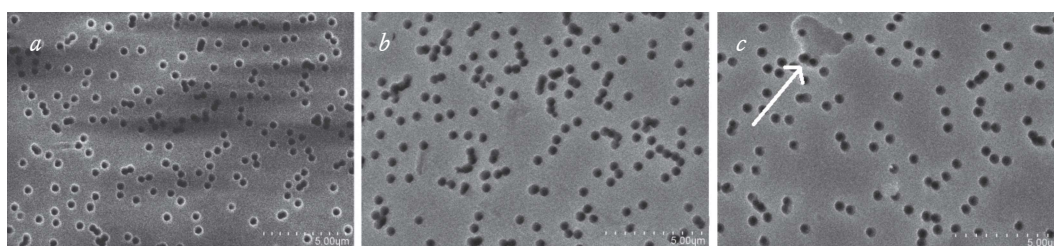


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение поверхности исходной ТМ (а), ТМ после плазменной модификации (b) и после стерилизации дозой 1 кГр (с)

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)

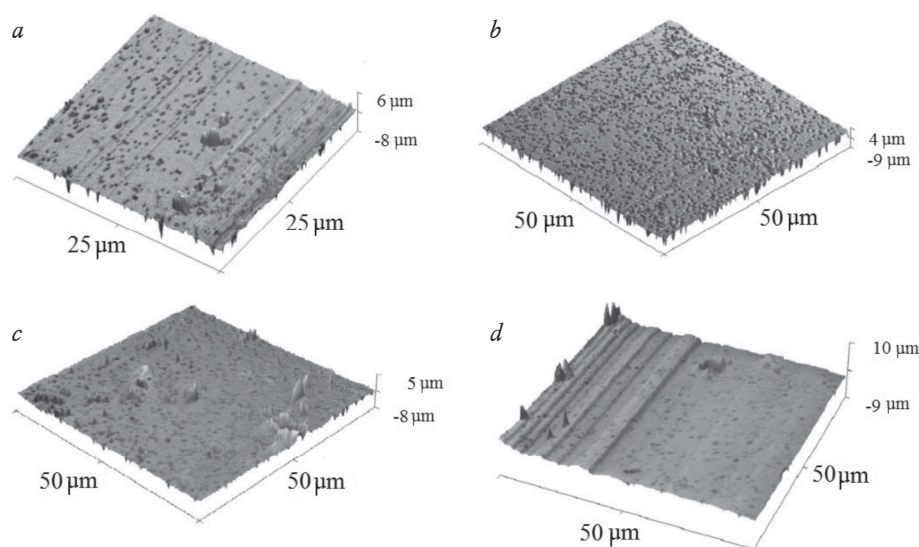


Рис. 2. Топография поверхности исходных ТМ (а), после плазменной модификации (b), после стерилизации (1 кГр) исходных (с) и плазменно модифицированных ТМ (d)

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

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

| Средние значения параметров поверхности ТМ: шероховатость $R_a$ , поверхностная энергия $\sigma_s$ , дисперсионная $\sigma_s^d$ и поляризационная $\sigma_s^p$ составляющие поверхностной энергии, угол смачивания: $\theta_w^0$ (вода), $\theta_g^0$ (глицерин)<br>Average values of TM surface parameters: roughness $R_a$ , surface energy $\sigma_s$ , dispersion $\sigma_s^d$ and polarization $\sigma_s^p$ components of surface energy, wetting angle: $\theta_w^0$ (water), $\theta_g^0$ (glycerin) |         |            |              |              |                        |                 |                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|--------------|--------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| Образец<br>Sample                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | $R_a^*$ | $\sigma_s$ | $\sigma_s^d$ | $\sigma_s^p$ | Полярность<br>Polarity | $\theta_w^{0*}$ | $\theta_g^{0*}$ |
| Пленка ПЭТФ<br>PET film                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0,002   | 36,76      | 29,15        | 7,61         | 0,2                    | 61,1            | 76,5            |
| ТМ исходная<br>TM naive                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0,031   | 29,95      | 5,97         | 23,98        | 0,8                    | 72,8            | 74,8            |
| ТМ + 1 кГр<br>ТМ + 1 kGy                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 0,028   | 43,73      | 0,30         | 43,43        | 0,99                   | 68,7            | 77,2            |
| ТМ + 10 кГр $\gamma$<br>ТМ + 10 kGy $\gamma$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 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<br>ТМ + pl 30 + 1 kGy                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 0,055   | 110,3      | 3,1          | 107,2        | 0,97                   | 36,0            | 70,5            |
| ТМ + pl 30 + 10 кГр<br>ТМ + 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  $\dim \sigma = \text{мДж/м}^2$ ; 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).

$\gamma$ -Излучение изотопа  $^{60}\text{Co}$  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 +  $\gamma$ -стерилизация наблюдался рост контактного угла смачивания на  $10-12^\circ$  (см. рис. 3).

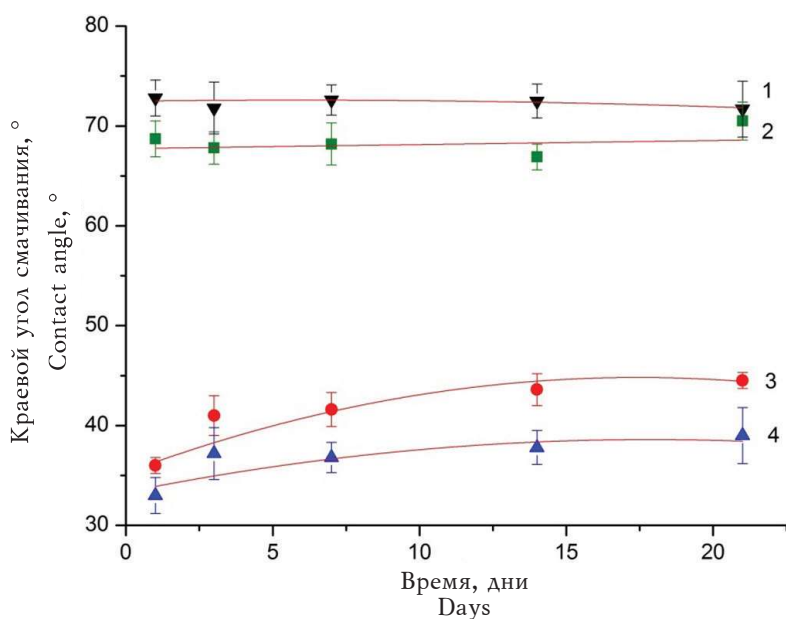


Рис. 3. Зависимость величины краевого угла смачивания  $\theta_w^0$  от времени хранения: 1 – исходная ТМ; 2 – после  $\gamma$ -стерилизации в дозе 1 кГр; 3 – после плазменной обработки и  $\gamma$ -стерилизации в дозе 1 кГр; 4 – после плазменной обработки

Fig. 3. Dependence of the value of contact angle of wetting  $\theta_w^0$  on storage time: 1 – virgin TM; 2 – after  $\gamma$ -sterilization in a dose of 1 kGy; 3 – after plasma treatment and  $\gamma$ -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  $\gamma$ -стерилизацией увеличивают долю поляризационной составляющей  $\sigma_p^z$ . Однако сочетание АНП +  $\gamma$ -стерилизация не способствовало вполне ожидаемому росту поляризации ТМ.

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

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

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).

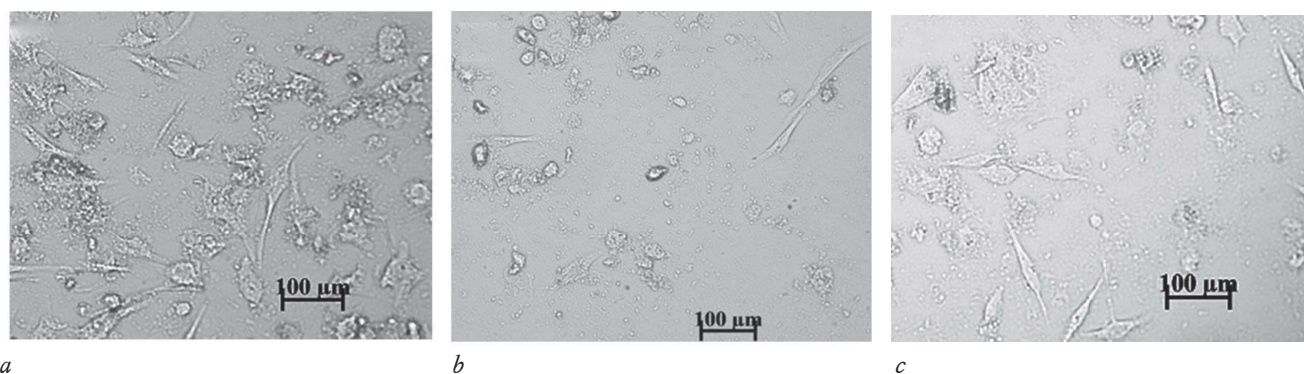


Рис. 4. Состояние 3-суточной культуры фибробластоподобных пренатальных стромальных клеток, выделенных из легких человека, в условиях сокультивирования с тестируемыми ТМ. Окраска на виментин (участки клеток коричневого цвета): *a* – контроль роста клеток; *b* – ТМ после стерилизации  $^{60}\text{Co}$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

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* – TM after sterilization of  $^{60}\text{Co}$ ; *c* – TM 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  $\text{Ca}^{2+}$ ) 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 уровней кальция и фосфора в биологических средах *in vitro* рассматриваются в качестве маркеров остеогенного направления развития МСК [19].

Т а б л и ц а 3  
T a b l e 3

| 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<br>№ group                                                                                                                                                                                                                         | Исследуемая группа<br>Study group                                                                                                     | pH                                   | Кальций<br>ионизированный,<br>мМ<br>Ionized calcium,<br>mM | Кальций<br>общий,<br>мМ<br>Calcium<br>total,<br>mM | Фосфат-<br>ионы,<br>мМ<br>Phosphate-<br>ions,<br>mM  | Калий<br>ионизирован-<br>ный, мМ<br>Ionized<br>otassium,<br>mM | ЩФ,<br>Ед/л<br>Alkaline<br>phospha-<br>tase,<br>U/l |
| Контрольная культура без ТМ<br>Control culture without TM                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                       |                                      |                                                            |                                                    |                                                      |                                                                |                                                     |
| 1                                                                                                                                                                                                                                           | Полная культуральная среда (ПКС), $n = 4$<br>Full culture medium (FCM), $n = 4$                                                       | 9,00<br>(8,89–9,12)                  | 1,15<br>(0,96–1,17)                                        | 1,64<br>(1,25–1,68)                                | 0,78<br>(0,73–0,80)                                  | 5,85<br>(5,7–5,95)                                             | 22<br>(19,5–24,5)                                   |
| 2                                                                                                                                                                                                                                           | Контроль роста фибробластоподобных клеток на пластике, $n = 4$<br>Control of the growth of fibroblast-like cells on plastics, $n = 4$ | 8,86<br>(8,78–9,01)                  | 1,21<br>(0,95–1,24)                                        | 1,58<br>(1,11–1,61)                                | 0,73<br>(0,67–0,77)                                  | 5,70<br>(5,25–5,95)                                            | 44,5*<br>(41,5–47)<br>$p_i < 0,00012$               |
| ТМ после стерилизации $^{60}\text{Co}$ в дозе 10 кГр<br>TM after sterilization $^{60}\text{Co}$ in a dose 10 kGry                                                                                                                           |                                                                                                                                       |                                      |                                                            |                                                    |                                                      |                                                                |                                                     |
| 3                                                                                                                                                                                                                                           | ТМ в ПКС без клеток, $n = 3$<br>TM in FCM without cells, $n = 3$                                                                      | 8,88<br>(8,85–8,88)                  | 1,18                                                       | 1,33<br>(1,27–1,36)                                | 0,69                                                 | 6,1*<br>$p_3 < 0,05$                                           | 18<br>(15–22)                                       |
| 4                                                                                                                                                                                                                                           | ТМ в контакте с клетками, $n = 3$<br>TM in contact with cells, $n = 3$                                                                | 9,03*<br>(9,03–9,04)<br>$p_3 < 0,05$ | 1,17                                                       | 1,62<br>(1,59–1,64)                                | 0,77<br>(0,76–0,77)                                  | 6,0*<br>$p_3 < 0,05$                                           | 45*<br>(45–47)<br>$p_3 < 0,05$                      |
| ТМ после обработки АНП с последующей стерилизацией $^{60}\text{Co}$ в дозе 10 кГр<br>TM after cold plasma treatment followed by sterilization $\text{Co}^{60}$ in a dose 10 kGry                                                            |                                                                                                                                       |                                      |                                                            |                                                    |                                                      |                                                                |                                                     |
| 5                                                                                                                                                                                                                                           | ТМ в ПКС без клеток, $n = 3$<br>TM in FCM without cells, $n = 3$                                                                      | 9,15*<br>(9,13–9,15)<br>$p_3 < 0,05$ | 1,18<br>(1,17–1,18)                                        | 1,27<br>(1,25–1,27)                                | 0,65*<br>(0,65–0,67)<br>$p_1 < 0,02$<br>$p_3 < 0,05$ | 6,1*<br>$p_1 < 0,05$                                           | 17*<br>(16–18)<br>$p_1 < 0,04$                      |
| 6                                                                                                                                                                                                                                           | ТМ в контакте с клетками, $n = 3$<br>TM in contact with cells, $n = 3$                                                                | 9,09*<br>(9,09–9,10)<br>$p_4 < 0,05$ | 1,13*<br>(1,12–1,13)<br>$p_4 < 0,05$<br>$p_5 < 0,05$       | 1,53<br>(1,52–1,82)                                | 0,76<br>(0,73–0,77)                                  | 6,0*<br>$p_3 < 0,05$                                           | 42*<br>(42–44)<br>$p_4 < 0,05$<br>$p_5 < 0,05$      |

П р и м е ч а н и е:  $n$  – количество исследованных образцов (лунок) в планшете.

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

N o t e:  $n$  – 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  $\gamma$ -стерилизация  $^{60}\text{Co}$  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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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  $\theta$  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  $\gamma$ -излучения радионуклида  $^{60}\text{Co}$  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  $\gamma$ -излучения

радионуклида  $^{60}\text{Co}$  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. *Petroroleum 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., Сви́дский 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 polymeric 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  $\gamma$ -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 micro-territories 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 argon 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. Морфо-функциональное состояние культуры стволовых клеток на 2D-матриксах, 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  $\gamma$ -radionuclide  $^{60}\text{Co}$ . *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 $\gamma$ -radionuclide $^{60}\text{Co}$

Filippova E.O.<sup>1,2</sup>, Pichugin V.F.<sup>1</sup>, Khlusov I.A.<sup>2,4</sup>, Dzyuman A.N.<sup>2</sup>, Zaitsev K.V.<sup>3</sup>, Gostyukhina A.A.<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> Siberian State Medical University (SSMU)  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation