

Исследование реакции тромбоцитов на а-C:H:SiO_x покрытие, полученное методом плазмохимического осаждения с использованием импульсного биполярного смещения

Жульков М.О.^{1,2}, Гренадёрв А.С.², Корнеев Д.С.³, Агаева Х.А.¹, Чернявский А.М.^{1,2}, Хлусов И.А.^{4,5}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) им. акад. Е.Н. Мешалкина Россия, 630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

² Институт сильноточной электроники Сибирского отделения Российской академии наук (ИСЭ СО РАН) Россия, 634055, г. Томск, пр. Академический, 2/3

³ Институт нефтегазовой геологии и геофизики им. А.А. Трофимука Сибирского отделения Российской академии наук (ИНГГ СО РАН) Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Коптюга, 3

⁴ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ) Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

⁵ Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ) Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучить в эксперименте *in vitro* адгезию тромбоцитов к а-C:H:SiO_x пленке на титане для оценки ее атромбогенного потенциала.

Материалы и методы. Тонкие (менее 1 мкм) а-C:H:SiO_x пленки наносили на титановые пластины марки ВТ-6 размером 10 × 10 мм² и толщиной 0,2 мм с помощью вакуумной ионно-плазменной установки с использованием импульсного биполярного смещения. Шероховатость поверхности оценивали согласно ГОСТ 2789-73 с помощью атомно-силового микроскопа. Исследуемые образцы культивировали при 37 °С в течение 30 мин в плазме крови человека, обогащенной тромбоцитами, подготавливали для сканирующей электронной микроскопии, после чего подсчитывали плотность распределения кровяных пластинок, адгезирующих к исследуемому покрытию.

Результаты. При одинаковом индексе шероховатости исследуемых образцов а-C:H:SiO_x пленка в 116 раз снижала (в сравнении с необработанным титаном) количество тромбоцитов на 1 мм² поверхности.

Заключение. Формирование на поверхности титанового сплава ВТ-6 тонкой пленки состава а-C:H:SiO_x методом плазмохимического осаждения с использованием импульсного биполярного смещения значительно снижает плотность распределения тромбоцитов в сравнении с необработанной металлической поверхностью. Полученные *in vitro* данные предполагают существенный атромбогенный потенциал данного вида покрытий на поверхности устройств, контактирующих с кровью.

Ключевые слова: адгезия тромбоцитов человека, *in vitro*, углеродная поверхность, модифицированная оксидами кремния, сканирующая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

✉ Гренадёрв Александр Сергеевич, e-mail: 1711Sasha@mail.ru.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 19-19-00186.

Соответствие принципам этики. Работа выполнена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации при получении добровольного информированного согласия на забор крови.

Для цитирования: Жульков М.О., Гренадёр А.С., Корнеев Д.С., Агаева Х.А., Чернявский А.М., Хлусов И.А. Исследование реакции тромбоцитов на а-С:Н:SiO_x покрытие, полученное методом плазмохимического осаждения с использованием импульсного биполярного смещения. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (3): 15–21. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-3-15-21>.

The study of platelet reaction on a-C:H:SiO_x coatings obtained via plasma enhanced chemical vapor deposition with bipolar bias voltage

Zhulkov M.O.^{1,2}, Grenadyorov A.S.², Korneev D.S.³, Agaeva H.A.¹, Chernyavsky A.M.^{1,2}, Khlusov I.A.^{4,5}

¹ Meshalkin National Medical Research Center of Ministry of Health of the Russian Federation
15, Rechkunovskaya Str., Novosibirsk, 630055, Russian Federation

² Institute of High Current Electronics of the Siberian Branch of the RAS
2/3 Akademicheskoy Av., Tomsk, 634055, Russian Federation

³ Trofimuk Institute of Petroleum Geology and Geophysics of the Siberian Branch of the RAS
3, Koptug Av., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

⁴ Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

⁵ National Research Tomsk Polytechnic University
30, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To study platelet adhesion to a-C:H:SiO_x film on titanium in an *in vitro* experiment to evaluate its antithrombogenic potential.

Materials and methods. Thin (less than 1 μm) a-C:H:SiO_x films were deposited on VT-6 titanium plates with a size of 10 × 10 mm² and a thickness of 0.2 mm using a vacuum ion-plasma unit using pulsed bipolar bias. The surface roughness was evaluated according to GOST 2789-73 using an atomic force microscope. The test samples were cultured at 37 °C for 30 min in platelet-rich human blood plasma, prepared for scanning electron microscopy, after which the distribution density of blood plates adhering to the test coating was calculated.

Results. With the same roughness index of the studied a-C:H:SiO_x samples, the film decreased 116 times (in comparison with untreated titanium) the platelet count per 1 mm² of the surface.

Conclusion. The deposition of a-C:H:SiO_x thin film on the surface of VT-6 titanium alloy by PACVD method using pulsed bipolar bias significantly reduces the distribution density of platelets in comparison with an untreated metal surface. *In vitro* data suggest a significant antithrombogenic potential of this type of coating on the surface of devices in contact with blood.

Key words: human platelet adhesion, *in vitro*, carbonic surface modified by silicon oxides, scanning electron microscopy, atomic force microscopy.

Conflict of interest. Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this article.

Source of financing. This work was financially supported by the Russian Science Foundation, grant No. 19-19-00186.

Conformity with the principles of ethics. The work was carried out in accordance with the principles of the Helsinki Declaration upon receipt of voluntary informed consent for blood sampling.

For citation: Zhulkov M.O., Grenadyorov A.S., Korneev D.S., Agaeva H.A., Chernyavsky A.M., Khlusov I.A. The study of platelet reaction on a-C:H:SiO_x coatings obtained via plasma enhanced chemical vapor deposition with bipolar bias voltage. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (3): 15–21. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-3-15-21>.

ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие имплантатов с биологической средой организма во многом зависит от их поверхностных свойств, которые играют непосредственную роль в различных постимплантационных биологических реакциях, включая преципитацию различных минералов, адсорбцию белка, адгезию и пролиферацию клеток [1, 2]. В приложении к приборам (механические насосы) и стендам для хирургического лечения ишемической болезни сердца избыточность воспалительных клеточно-молекулярных реакций на границе раздела «искусственная поверхность – ткань» повышает риск тромбоза. В связи с этим возобновился интерес к методам модификации поверхности биосовместимых искусственных материалов, способствующим их биоинертности [3].

Одним из широко обсуждаемых решений проблемы детерминированной биосовместимости в диапазоне биоинертность/биоактивность является нанесение тонких алмазоподобных углеродных покрытий (diamond-likecoating, DLC). С начала 2000-х гг. показано, что DLC пленки биоинертны, устойчивы к механической нагрузке и коррозии, не цитотоксичны в отношении моноцитов/макрофагов, фибробластов, остеобластов [4]. Благодаря оптимальному соотношению sp³-, sp²-гибридизированных атомов углерода они обладают достаточно хорошей гемосовместимостью [5, 6]. В последние 5 лет в связи с определенной неудовлетворенностью результатами биомедицинского тестирования DLC покрытий накапливаются публикации по их физико-химической модификации (в частности, кремнием и его оксидами), улучшающей потребительские свойства а-C:H:SiO_x поверхности на медицинских материалах и изделиях [7].

На базе Института сильноточной электроники Сибирского отделения Российской академии наук разработан новый подход плазмохимического нанесения а-C:H:SiO_x пленок на внутренние поверхности и движущиеся части аппаратов вспомогательного кровообращения, основанный на использовании импульсного биполярного смещения подложки.

Цель работы – изучить в эксперименте *in vitro* адгезию тромбоцитов к а-C:H:SiO_x пленке на титане для оценки ее атромбогенного потенциала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исследуемых образцов выступали титановые пластины марки ВТ-6 размером 10 × 10 мм и толщиной 0,2 мм с нанесенной тонкой (менее 1 мкм) а-C:H:SiO_x пленкой (пять образцов Т2). Контрольными образцами служили титановые образцы без а-C:H:SiO_x покрытия (пять образцов Т1). Нанесение пленки происходило на вакуумной ионно-плазменной установке с технологическими параметрами осаждения, подробно описанными в [8].

Среднее квадратическое отклонение профиля R_q по ГОСТ 25142-82 определяли согласно ГОСТ 2789-73 с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) Solver P47 (NT-MDT, Россия) с площади 5 мкм². Для проведения теста адгезии тромбоцитов из крови здорового взрослого донора мужского пола (предназначенной для гемотрансфузии) получали 50 мл плазмы, обогащенной тромбоцитами, с помощью центрифугирования и сепарации форменных элементов крови [9, 10].

Полученную плазму разводили 0,9%-м раствором хлорида натрия в соотношении 1:1. Исследуемые образцы погружали в полученную суспензию тромбоцитов и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Затем образцы промывали дистиллированной водой для удаления слабо адгезированных клеток. Оставшиеся на поверхности тромбоциты фиксировали в 2%-м растворе глутарового альдегида при комнатной температуре в течение 1 ч и высушивали в термостате при 37 °С.

Образцы покрывали слоем хрома толщиной 20 нм в атмосфере аргона при ионном токе 6 мА и давлении 0,1 мм рт. ст. с использованием установки Q150T ES (Quorum Technologies, Великобритания) и подвергали сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе Mira3 (Tescan, Чехия). На каждом образце производили подсчет количества адгезированных тромбоцитов в 20 случайных полях зрения согласно принципам морфометрии [11].

Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро – Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию

Левена. В том случае, когда распределение в экспериментальных группах было нормальным и соблюдалось межгрупповое равенство дисперсий, дальнейшую обработку проводили с помощью метода параметрической статистики – критерия Ньюмена – Кейлса. При распределении, отличном от нормального, и несоблюдении межгруппового равенства дисперсий использовали методы непараметрической статистики – критерий Краскела – Уоллиса. Результаты представлены как среднее и стандартная ошибка среднего $M \pm m$. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты АСМ показали определенное сглаживание неровностей поверхности сплава титана ВТ-6

после формирования а-С:H:SiO_x пленки (рис. 1). Тем не менее различия в индексе шероховатости R_q не достигали статистических различий (таблица). Полученные данные соответствуют результатам, опубликованным ранее [12].

В биологической части исследования использование цельной плазмы крови, обогащенной тромбоцитами, приводило к образованию их микроконгломератов и кристаллизации растворенных солей на поверхности образцов (рис. 2), что затрудняло подсчет числа отдельных клеток. Разведение плазмы изотоническим раствором хлорида натрия в соотношении 1:1 с последующей промывкой образцов раствором дистиллированной воды позволили получить изображения, доступные для морфометрического анализа (рис. 3).

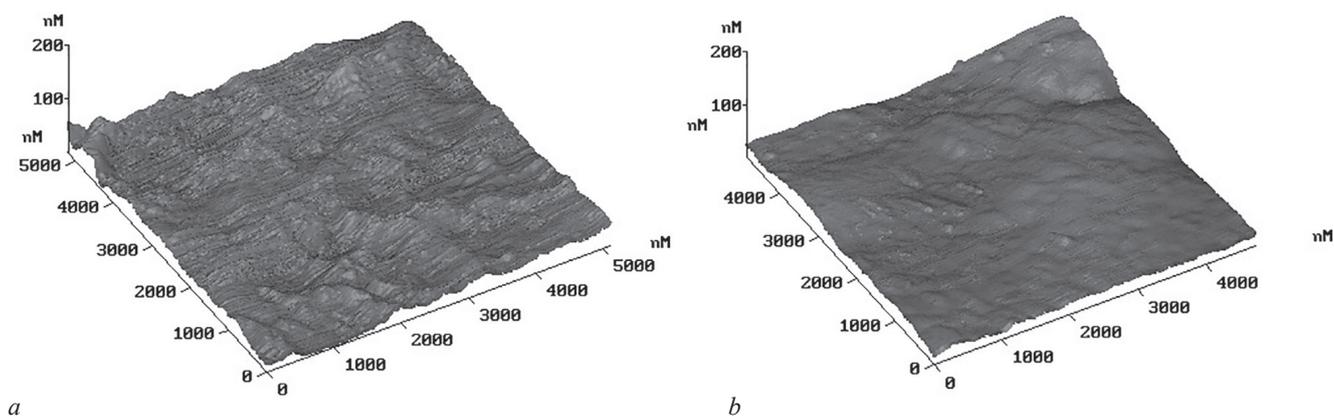


Рис. 1. АСМ-изображения морфологии поверхности титана (а) и титана с нанесенной а-С:H:SiO_x пленкой (b)

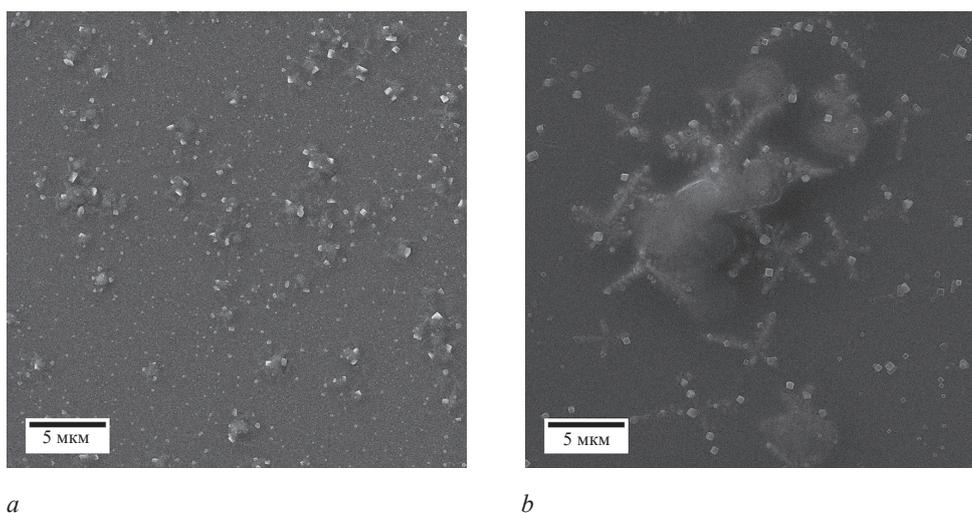


Рис. 2. СЭМ-изображение конгломератов тромбоцитов и кристаллов солей на поверхности образца титана марки ВТ-6. Шкала 25 мкм (а) и 5 мкм (b)

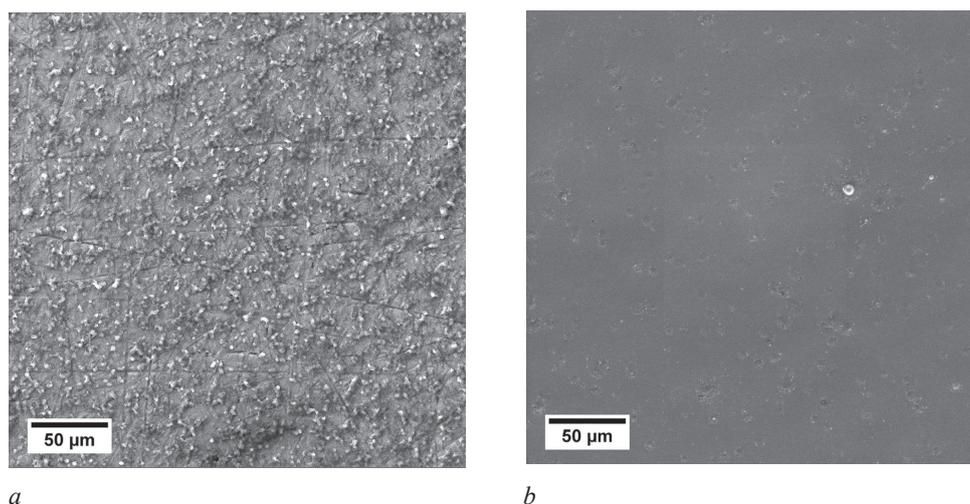


Рис. 3. СЭМ-изображения поверхности образца титана Т1 (а) и Т2 с нанесенной а-С:Н:SiO_x пленкой (b) после проведения теста на адгезию тромбоцитов. Шкала 50 мкм

Т а б л и ц а

Плотность распределения адгезированных тромбоцитов на исследуемых образцах согласно сканирующей электронной микроскопии, $M \pm m$			
Маркировка группы	Наименование группы, $n = 5$	Среднее число клеток на площади поверхности 250 мкм ²	Индекс шероховатости поверхности образцов, Rq , нм
T1	Титан марки VT-6 без обработки	290 ± 72 $n_1 = 20$	$7,9 \pm 0,8$
T2	Титан марки VT-6 с а-С:Н:SiO _x пленкой	$2,5 \pm 1,8$ $n_1 = 20$ $<0,001$	$7,2 \pm 0,7$

Примечание. Число изученных образцов в каждой группе – n . Число изученных полей зрения на каждом образце – n_1 .

Подсчет количества тромбоцитов показал, что а-С:Н:SiO_x покрытие на титановой подложке резко снижает их поверхностную адгезию. В группе Т2 (титан с покрытием) число кровяных пластинок оказалось в 116 раз меньше, чем на поверхности образцов из группы Т1 (без плазмохимической обработки). Следует подчеркнуть отсутствие статистически значимых различий в индексе шероховатости изучаемых поверхностей (см. таблицу), поскольку рельеф имплантатов и других медицинских изделий имеет существенное биологическое значение.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования DLC покрытий, модифицированных кремнием и его оксидами, были сосредоточены, преимущественно, на изучении их физико-механических свойств [13]. Так, формирование связей Si–C значительно повышает адгезию покрытия к подложкам при сохранении высоких трибологических характеристик DLC пленок [12]. Вместе с тем физико-химические процессы улучшения гемосовместимости материалов, обусловленного как DLC [14], так и Si-DLC пленками, остаются в области ги-

потез. В связи с одинаковой и незначительной шероховатостью исследуемых образцов (см. таблицу), требуемой для изделий, контактирующих с кровью, из всего разнообразия биологически активных физико-химических факторов (поверхностная энергия, фазовый и элементный состав, растворимость, наличие биологически активных (лекарственных) молекул в составе поверхности) [15] на первый план в определении гемосовместимости может выходить заряд (дзета(ζ)-потенциал) поверхности.

P.V. Sawyer и соавт. предположили, что антикоагулянтные свойства имплантируемым материалам способен придавать электростатический заряд их поверхности [16]. В свою очередь Y. Ikada и соавт. [17] высказали гипотезу, что в биологических жидкостях имеет место взаимосвязь между поверхностным ζ -потенциалом и противосвертывающими свойствами поверхности медицинских изделий. Действительно, введение кремния в состав тонких пленок значительно меняет их электрические и биологические характеристики [18].

В связи с этим установленная *in vitro* атромбогенность а-С:Н:SiO_x пленки на титане является ценным

потребительским свойством для приборов и изделий, контактирующих с кровью, и требует дальнейшего изучения электрокинетических и других физико-химических характеристик ее биологической инертности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование на поверхности титанового сплава ВТ-6 тонкой а-С:H:SiO_x пленки, полученной методом плазмохимического осаждения с использованием импульсного биполярного смещения подложки, более чем в 100 раз снижает плотность распределения тромбоцитов человека в сравнении с необработанной металлической поверхностью. Полученные *in vitro* данные позволяют предполагать существенный атромбогенный потенциал а-С:H:SiO_x покрытий на поверхности устройств, контактирующих с кровью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ali N., Kousar Y., Okpalugo T. I., Singh V., Pease M., Ogwu A.A., Jackson M.J. Human micro-vascular endothelial cell seeding on Cr-DLC thin films for mechanical heart valve applications. *Thin Solid Films*. 2006; 515 (1): 59–65. DOI: 10.16/j.tsf.2005.12.023.
2. Goodman S.L., Tweden K.S., Albrecht R.M. Platelet interaction with pyrolytic carbon heart valve leaflets. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*. 1996; 32 (2): 249–258. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199610)32:2<249::AID-JBM15>3.0.CO;2-E.
3. Love C.A., Cook R.B., Harvey T.J., Dearnley P.A., Wood R.J.K. Diamond like carbon coatings for potential application in biological implants – a review. *Tribology International*. 2013; 63 (2013): 141–150. DOI: 10.1016/j.triboint.2012.09.006.
4. Dearnaley G., Arps J.H. Biomedical applications of diamond-like carbon (DLC) coatings: a review. *Surface & Coatings Technology*. 2005; 200 (7): 2518–2524. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2005.07.007.
5. Kwok S.C.H., Wang J., Chu P.K. Surface energy, wettability, and blood compatibility phosphorus doped diamond-like carbon films. *Diamond and Related Materials*. 2005; 14 (1): 78–85. DOI: 10.1016/j.diamond.2004.07.019.
6. Sheeja D., Tay B.K., Nung L.N. Tribological characterization of surface modified UHMWPE against DLC-coated Co–Cr–Mo. *Surface & Coatings Technology*. 2005; 190 (2–3): 231–237. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2004.02.051.
7. Bociaga D., Sobczyk-Guzenda A., Komorowski P., Balcerzak J., Jastrzebski K., Przybyszewska K., Kaczmarek A. Surface characteristics and biological evaluation of Si-DLC coatings fabricated using magnetron sputtering method on Ti6Al-7Nb Substrate. *Nanomaterials*. 2019; 9 (6): 812. DOI: 10.3390/nano9060812.
8. Grenadyorov A.S., Solovyev A.A., Oskomov K.V., Rabotkin S.V., Elgin Y.I., Sypchenko V.S., Ivanova N.M. Effect of substrate bias and substrate/plasma generator distance on properties of a-C:H:SiO_x films synthesized by PACVD. *Thin Solid Films*. 2019; 669: 253–261. DOI: 10.1016/j.tsf.2018.11.005.
9. Lopes F.S., Oliveira J.R., Milani J., Oliveira L.D., Machado J.P.B., Trava-Airoldi V.J., Marciano F.R. Biomaterialized diamond-like carbon films with incorporated titanium dioxide nanoparticles improved bioactivity properties and reduced biofilm formation. *Materials Science and Engineering: C*. 2017; 81: 373–379. DOI: 10.1016/j.msec.2017.07.043.
10. Wen F., Liu J., Xue J. The Studies of Diamond-Like Carbon Films as Biomaterials: review. *Colloid and Surface Science*. 2017; 2 (3): 81. DOI: 10.11648/j.css.20170203.11.
11. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990: 384.
12. Grenadyorov A.S., Solovyev A.A., Oskomov K.V., Onischenko S.A., Chernyavskiy A.M., Zhulkov M.O., Kaichev V.V. Modifying the surface of a titanium alloy with an electron beam and a-C:H:SiO_x coating deposition to reduce hemolysis in cardiac assist devices. *Surface and Coatings Technology*. 2020; 381: 125113. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2019.125113.
13. Bociaga D., Kaminska M., Sobczyk-Guzenda A., Jastrzebski K., Swiatek L., Olejnik A. Surface properties and biological behaviour of Si-DLC coatings fabricated by a multi-target DC–RF magnetron sputtering method for medical applications. *Diamond and Related Materials*. 2016; 67: 41–50. DOI: 10.1016/j.diamond.2016.01.025.
14. Yang P., Huang N., Leng Y.X., Chen J.Y., Fu R.K.Y., Kwok S.C.H., Chu P. K. Activation of platelets adhered on amorphous hydrogenated carbon (a-C:H) films synthesized by plasma immersion ion implantation-deposition (PIII-D). *Biomaterials*. 2003; 24 (17): 2821–2829. DOI: 10.1016/s0142-9612(03)00091-7.
15. Коков Л.С., Капранов С.А., Долгушин Б.И., Троицкий А.В., Протопопов А.В., Мартов А.Г. Сосудистое и внутриорганное стентирование. М.: Изд. дом «Грааль», 2003: 384.
16. Sawyer P.M., Janczuk B., Bruque J. Materials with negative charge surface and their blood compatibility. *Tasaio*. 1964; 10 (3): 316–321.
17. Ikada Y. Blood-compatible polymers. *Polymers in medicine*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1984: 103–140.
18. Пичугин В.Ф., Сурменова М.А., Сурменев Р.А., Хлюсов И.А., Эппле М. Исследование физико-химических и биологических свойств кальцийфосфатных покрытий, созданных методом ВЧ-магнетронного распыления кремний-замещенного гидроксипатита. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*. 2011; 9: 54–61. DOI: 10.1134/S1027451011090138.

Вклад авторов

Жульков М.О. – проведение исследований, обработка полученного материала, написание статьи. Гренадёр А.С. – формирование покрытий, проведение исследований, написание статьи. Корнеев Д.С. – проведение исследований, обработка полученного

материала. Агаева Х.А. – проведение исследований, написание статьи. Чернявский А.М. – анализ полученного материала, редактирование статьи. Хлусов И.А. – анализ полученного материала, редактирование статьи.

Сведения об авторах

Жульков Максим Олегович, стажер-исследователь, Центр хирургии аорты, коронарных и периферических артерий, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск. ORCID 0000-0001-7976-596X.

Гренадёр Александр Сергеевич, канд. техн. наук, науч. сотрудник, лаборатория прикладной электроники, ИСЭ СО РАН, г. Томск. ORCID 0000-0001-6013-0200.

Корнеев Дмитрий Сергеевич, канд. хим. наук, науч. сотрудник, лаборатория физико-химических исследований ядра и пластовых флюидов, ИНГГ СО РАН, г. Новосибирск. ORCID 0000-0002-3398-5729.

Агаева Хава Абдуллаевна, клинический ординатор, Центр хирургии аорты, коронарных и периферических артерий, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина. ORCID 0000-0002-1648-1529.

Чернявский Александр Михайлович, д-р мед. наук, профессор, руководитель Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина. ORCID 0000-0001-9818-8678.

Хлусов Игорь Альбертович, д-р мед. наук, профессор, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ; профессор, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск. ORCID 0000-0003-3465-8452.

(✉) **Гренадёр Александр Сергеевич**, e-mail: 1711Sasha@mail.ru.

Поступила в редакцию 03.02.2020

Подписана в печать 06.05.2020