

УДК 577.11:544.558
©Коллектив авторов

ИЗМЕНЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ СВОЙСТВ И БИОСОВМЕСТИМОСТИ МАТРИКСОВ ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЛАЗМОЙ ВЫСОКОЧАСТОТНОГО МАГНЕТРОННОГО РАЗРЯДА

Е.Н. Большасов¹, Л.В. Антонова^{2}, В.Г. Матвеева², В.А. Новиков³, Е.В. Шестериков¹,
Н.Л. Богомолова¹, А.С. Головкин², С.И. Твердохлебов¹, О.Л. Барбараиш², Л.С. Барбараиш²*

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск

²Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6; тел.: 384-264-38-02; эл. почта: antonova.la@mail.ru

³Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

В работе изучена возможность модифицирования поверхности биорезорбируемого полимерного материала (поликапролактона, PCL) в плазме аномально тлеющего разряда, возникающего при высокочастотном магнетронном распылении твердотельной мишени, изготовленной из гидроксиапатита. Исследовано изменение физико-химических свойств поверхности поликапролактона в зависимости от длительности воздействия плазмы (30, 60, 150 с). Плазменная обработка привела к увеличению шероховатости и размеров кристаллитов на поверхности PCL, повышению поверхностной свободной энергии и гидрофильности. Увеличение времени обработки способствовало насыщению поверхности полимерного материала ионами распыляемой мишени (кальцием, фосфором). Проведена оценка влияния длительности экспозиции плазменной обработки PCL на поведение культивируемых на их поверхности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ). Поверхность полимера, модифицированного в плазме аномально тлеющего разряда, стимулировала адгезию и последующую пролиферацию ММСК КМ. При этом максимальные показатели достигались при обработке поверхности в течение 60 с. Данный вид плазменной обработки не снижал клеточную жизнеспособность. Таким образом, обработка в плазме аномально тлеющего разряда, возникающего при высокочастотном магнетронном распылении твердотельной мишени, изготовленной из гидроксиапатита, способствует повышению биосовместимости поверхности биodeградируемых полимерных материалов и потенциально может быть использована в тканевой инженерии.

Ключевые слова: модификация поверхности, поликапролактон, шероховатость, свободная энергия, гидрофильность, биосовместимость

DOI: 10.18097/PBMC20166201056

ВВЕДЕНИЕ

Тканевая инженерия в настоящее время является одной из самых многообещающих стратегий восстановления повреждённых органов и тканей [1]. Для её реализации необходимы, по крайней мере, два основных компонента: клетки предшественники и специализированный носитель клеток (матрикс, scaffold), обеспечивающий условия для нормального протекания процессов гисто- и морфогенеза [2].

В 80-90 годы 20 века для изготовления матриксов применяли биостабильные материалы, не изменяющие свою структуру и свойства (полиэтилен, фторопласт, полипропилен) [3], металлы (нержавеющие стали, титан и его сплавы) [4], керамику (окислы алюминия и циркония) [5]. Существенным недостатком таких материалов была их неспособность в полной мере интегрироваться в организм, что серьёзно ограничивало потенциал тканевой инженерии.

Следующим этапом развития медицинского материаловедения стало исследование возможности использования биорезорбируемых природных и синтетических полимеров в тканевой инженерии. Биорезорбируемые полимеры под действием физиологических жидкостей организма способны

деградировать (в идеале на углекислый газ и воду) и постепенно замещаться собственными функциональными тканями, что существенно повышает качество тканеинженерных конструкций [6].

Среди природных полимеров внимания заслуживают такие материалы, как фибрин, эластин и коллаген. Наряду с высокой прочностью, эластичностью и упругостью, свойственной природным полимерам, они обладают рядом недостатков, связанных со значительным изменением свойств в зависимости от источника материалов, потенциальной возможностью бактериальной или вирусной контаминации, высоким риском отторжения, обусловленным антигенным откликом [7].

Биорезорбируемые синтетические полимеры, как правило, демонстрируют удовлетворительные механические свойства, которые хорошо воспроизводятся при синтезе различных партий полимера. Широкое применение биорезорбируемых полимеров в тканевой инженерии обусловлено возможностью контролировать их химический состав и молекулярную массу, высокой чистотой синтезированных полимеров и их относительно низкой себестоимостью [8]. Для изготовления биорезорбируемых матриксов широко применяются

такие полимерные материалы, как полигликолевая кислота, полимолочная кислота, сополимеры молочной и гликолевой кислот, поликапролактон [9].

Однако использование синтетических полимеров в тканевой инженерии ограничено высокой гидрофобностью их поверхности, что препятствует клеточной интеграции с матриксом [10]. Модифицирование полимерных материалов позволяет в широких пределах изменять характеристики поверхности (смачиваемость, химический состав, электрический потенциал), стимулируя процессы клеточной адгезии, пролиферации и дифференцировки [11].

Одним из наиболее перспективных способов увеличения свободной энергии поверхности является обработка в плазме, которая увеличивает шероховатость поверхности, способствует уменьшению краевого угла смачивания водой, тем самым стимулируя адгезию и распластывание различных типов клеток на обработанной поверхности [12]. Для модифицирования поверхности биodeградируемых полимеров широкое распространение получили методы обработки в “холодной” плазме: коронного разряда (Corona Discharge), барьерного разряда (Dielectric Barrier Discharges), радиочастотного и микроволнового разрядов (RF Discharges, MW Discharges) [13]. Однако в научно-технической литературе на сегодняшний день практически отсутствует информация по модифицированию поверхности биорезорбируемых полимеров в плазме аномально тлеющего разряда, возникающего в процессе высокочастотного магнетронного распыления (ВЧМР) твердых диэлектрических мишеней. Вместе с тем, применение метода ВЧМР для модификации биорезорбируемых полимеров позволяет в широких пределах изменять химический состав обрабатываемой поверхности, не только путём изменения рабочей атмосферы, но и путём изменения состава распыляемой мишени [14, 15].

Целью нашей работы стало изучение возможности модификации поверхности биорезорбируемого полимера поликапролактона (PCL) в плазме аномально тлеющего разряда, возникающего при ВЧМР распылении мишени из гидроксиапатита (ГА). Исследовано влияние времени модификации на морфологию и свободную энергию поверхности, а также способность модифицированных поверхностей создавать условия для прикрепления и дальнейшей жизнедеятельности клеток.

МЕТОДИКА

Приготовление образцов для исследований

Изучение влияния плазмы высокочастотного разряда на свойства поверхности биodeградируемых полимерных материалов проведено на полимерных плёнках, полученных из 4% раствора полимерного материала в дихлорметане (“Pangeac”, Испания). В качестве синтетического биорезорбируемого полимера был использован поликапролактон PURASORB® PC 12 (PCL) (“Purac”, Испания). PCL представляет собой

алифатический полукристаллический полиэфир (степень кристалличности уменьшается с увеличением молекулярной массы) с температурой стеклования порядка -60°C и температурой плавления в диапазоне $59-64^{\circ}\text{C}$. PCL обладает хорошей растворимостью в ряде органических растворителей, совмещается с другими биodeградируемыми полимерами, что и стимулировало исследования возможностей его потенциального применения в регенеративной медицине [16].

Для приготовления пленки раствор полимера в количестве 12 ± 1 г помещали в специально изготовленную стеклянную ванну с полированным дном (основанием). Через 24 ч после удаления растворителя и формирования пленки ванну заполняли дистиллированной водой для отделения пленки от ванны. Полученную полимерную плёнку помещали в термостат с температурой 35°C на 24 ч для удаления остатков влаги.

Модифицирование поверхности

Для модифицирования поверхности использовали магнетронную распылительную систему, в вакуумной камере которой горизонтально размещён протяжённый магнетрон с мишенью размером $330 \times 120 \times 6$ мм, питаемый ВЧ-генератором с максимальной мощностью 4 кВт и рабочей частотой 13,56 МГц. В работе использовали мишень, изготовленную из порошка гидроксиапатита ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$). Модификацию проводили при следующих технологических режимах: предварительное давление в камере 5×10^{-5} Па; рабочее давление Ar – 3×10^{-1} Па; ВЧ мощность 350 Вт; расстояние между мишенью и образцом 16 см; продолжительность модифицирования 30 с, 60 с, 150 с. Контролем служили плёнки PCL, немодифицированные плазмой.

Исследование рельефа поверхности

Исследование рельефа поверхности проводили методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) с использованием микроскопа “Solver-HV” (“NT-MDT”, Россия). Для измерения применяли микромеханические зонды (кантилеверы) марки NSG11 (“NT-MDT”) с радиусом закругления острия иглы 10 нм и концентрацией легирующей примеси 5×10^{20} см $^{-3}$, область сканирования составила 30×30 мкм и 2×2 мкм. Измерения выполняли на воздухе при нормальных условиях в полуконтактном режиме работы. Обработку полученных АСМ изображений осуществляли с помощью программного комплекса Gwiddion 2.25.

Изучение элементного состава поверхности

Изучение элементного состава образцов проводили методом рентгенофлуоресцентного анализа (XRF) с использованием спектрометра Shimadzu XRF 1800 (Япония) по каналам кальция (Ca), фосфора (P), кислорода (O) и хлора (Cl) при следующих рабочих параметрах: ускоряющее напряжение 40 кВ, скорость сканирования 8 град./мин, шаг сканирования 0,1.

Исследование характера смачиваемости поверхности

Смачиваемость образцов исследовали на установке “Easy Drop” (“Krüss”, Германия) методом “сидячей” капли путём измерения краевого угла смачивания капли жидкости объёмом 3 мкл, помещённой на исследуемую поверхность. Измерение краевого угла смачивания проводили спустя одну минуту после помещения жидкости на исследуемую поверхность. В качестве смачивающих жидкостей использовали глицерин и воду. С целью исключения загрязнения исследуемой поверхности и последующего искажения результатов измерения выполняли сразу после модификации поверхности. Полная поверхностная энергия, полярные и дисперсные компоненты поверхности были рассчитаны по методу Owens-Wendt-Rabel-Kaelble (OWRK) [17].

Оценка клеточной адгезии и жизнеспособности

Для оценки эффективности адгезии клеток к модифицированной поверхности и клеточной жизнеспособности после взаимодействия с поверхностью использовали мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК КМ) второго пассажа, полученные из бедренных костей крыс линии Wistar. Исследование выполнено *in vitro*. Для этого из плёнок модифицированного и немодифицированного полимера вырезали диски площадью 1,8 см², которые помещали на дно 24-луночного планшета. На диски высевали ММСК КМ в концентрации $2,5 \times 10^5$ клеток на лунку и культивировали в среде DMEM (“Gibco”, США), содержащей 1% HEPES буфера, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл амфотерицина В (“Sigma Aldrich”, США), при температуре 37°C и 5% CO₂ в течение 5 сут.

Определение фенотипа и жизнеспособности ММСК КМ до и после заселения на матрицы выполняли методом проточной лазерной цитофлуориметрии. Для флуоресцентного окрашивания использовали суспензию ММСК КМ, которую получали путём трипсинизации заселённой клетками поверхности матриц или культурального пластика при помощи 0,5% раствора трипсина-ЭДТА (“Sigma Aldrich”) в течение 10 мин при температуре 37°C. После термостатирования проводили “гашение” трипсина добавлением полной культуральной среды и последующее двукратное отмывание клеток фосфатно-солевым буфером. Фенотип клеток определяли с помощью моноклональных антител CD90, меченных флуоресцеин-изоцианатом (FITC) (FITC mouse anti-Rat CD90 (“BD Bioscience Pharmingen”, США)), и CD45, конъюгированных с фикоэритрином (PE) (PE mouse anti-Rat CD45 (“BD Bioscience Pharmingen”). Пробоподготовку проводили в соответствии с протоколом фирмы производителя. Цитофлуориметрический анализ выполняли на проточном лазерном цитометре FACS Calibur (“Becton Dickinson”, США).

Предварительную оценку жизнеспособности клеток до заселения на плёнки и через 5 суток культивирования выполняли методом проточной

цитофлуориметрии с помощью набора Annexin V: PE Apoptosis Detection Kit (“BD Biosciences”), в котором используется комбинированное окрашивание суспензии клеток Annexin V, конъюгированным с PE, и ДНК красителем 7-AAD. В качестве контролей использовали ММСК КМ, снятые методом трипсинизации через 5 дней инкубации с поверхности матриц, не подвергшихся модификации (контроль 1), и культурального пластика (контроль 2), который является “золотым стандартом” поверхности для культивирования клеток. Относительное количество жизнеспособных клеток, некротически изменённых и находящихся в различных стадиях апоптоза (ранний и поздний) представлено в процентном соотношении (%) от общего количества клеток.

Окраску клеток для флуоресцентной микроскопии проводили флуорохромом PKH26 (“Sigma Aldrich”) и ядерным красителем Hoechst 33342 (“Sigma Aldrich”). Детекцию флуоресцентно меченных ММСК КМ на матрицах выполняли на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (“Carl Zeiss”, Германия). Эффективность адгезии клеток к поверхности матриц оценивали по количеству прикрепившихся клеток, видимых в десяти полях зрения микроскопа, усреднённых и пересчитанных на 1 мм².

Методы статистической обработки

Полученные данные были проанализированы с использованием методов статистического описания и статистической проверки гипотез, доступных в пакете программ Statistica (версия 6.0). Для анализа данных был использован гипотеза нормального распределения (тест Колмогорова-Смирнова). В случае нормального распределения статистическая значимость была оценена с помощью критерия Стьюдента. Если анализируемые показатели имели ненормальное распределение, то оценку достоверности различий определяли с помощью непараметрических критериев. Для оценки достоверности различий трёх и более показателей внутри одной группы использовали критерий Фридмана, при проведении попарных сравнений – критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони. Данные представлены как медиана и 25, и 75 квартили (Me (25%; 75%)). При всех видах статистического анализа уровень значимости составлял 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены АСМ изображения, полученные после различной продолжительности обработки поверхности PCL ВЧМР плазмой.

Исследования поверхности PCL с высоким разрешением выявили изменение рельефа после модифицирования, при этом увеличение времени воздействия плазмой приводило к увеличению шероховатости полимера (табл. 1). Так, необработанная поверхность PCL была сформирована частицами веретенообразной формы, представляющими собой кристаллические области полимера средней длиной 390 ± 130 нм и шириной 105 ± 25 нм. Образование кристаллической структуры PCL обусловлено

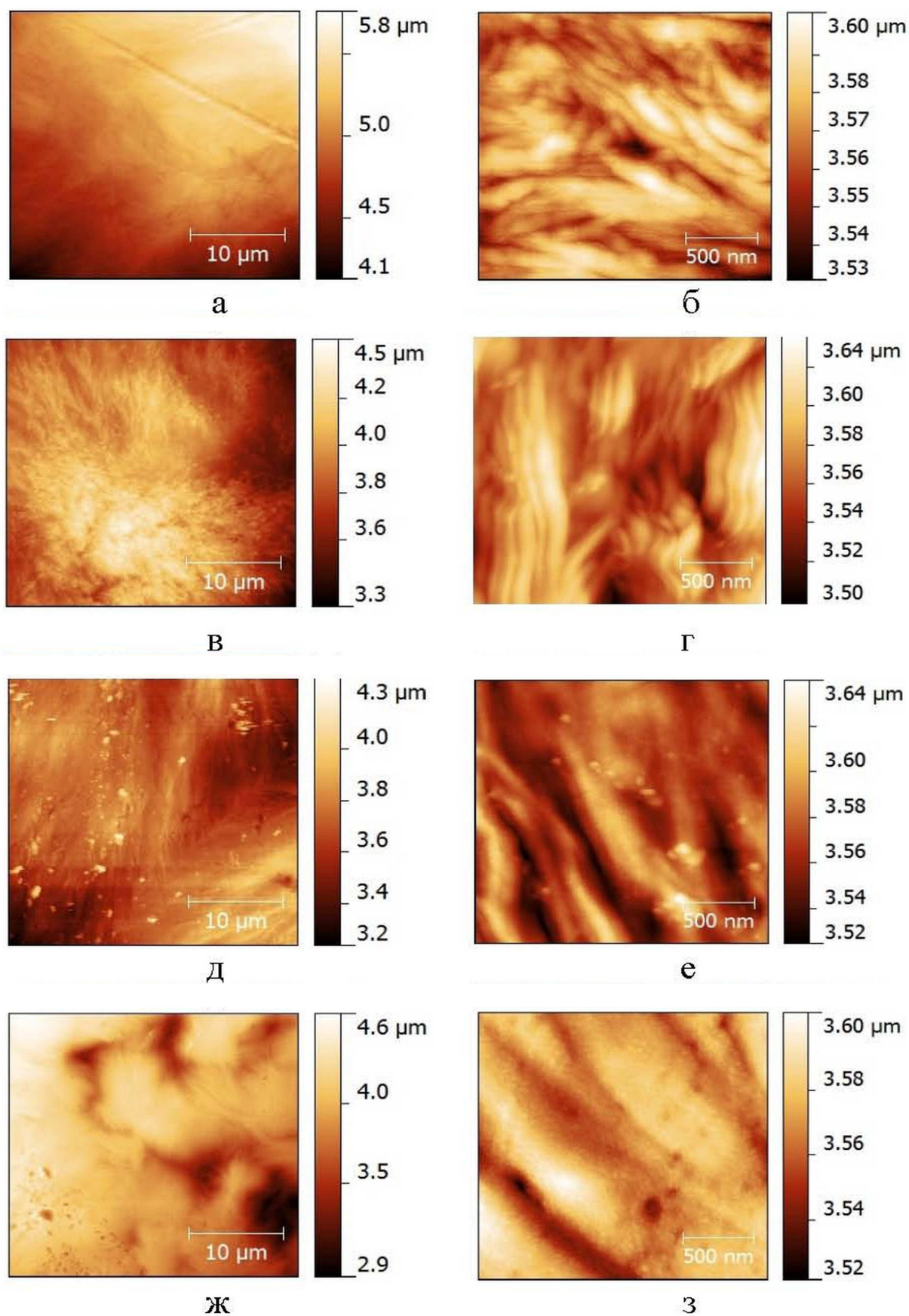


Рисунок 1. АСМ изображения поверхности PCL при различной длительности воздействия ВЧМР плазмой: (а, б) - без обработки (0 с); (в, г) - 30 с; (д, е) - 60 с; (ж, з) - 150 с.

Таблица 1. Среднеквадратичная шероховатость и свободная поверхностная энергия исследуемых образцов.

Время модифициров. (сек)	Среднеквадратичная шероховатость R_{ms} (nm)	Угол смачивания водой θ (град)	Угол смачивания глицерином θ (град)	Свободная энергия поверхности γ (мДж/м ²)	Дисперсная компонента γ^d (мДж/м ²)	Полярная компонента γ^p (мДж/м ²)
0	38,8±4,2	76,9±4,97	84,8±3,11	32,91±1,98	0,8±0,29	32,11±1,69
30	42,6±2,1	41,9±3,29	47,3±3,29	55,84±4,32	12,34±2,67	45,50±1,65
60	51,2±3,4	34,8±3,58	40,1±5,58	62,51±3,41	9,15±1,32	53,36±2,09
150	68,1±4,8	12,8±2,32	24,7±3,62	72,78±5,34	10,90±1,32	61,88±3,55

высокой скоростью его кристаллизации даже в условиях быстрого охлаждения из расплава [18]. После воздействия ВЧМР плазмы на PCL в течение 30 с отмечалось увеличение длины веретенообразных частиц до 850 ± 280 нм при средней ширине 95 ± 31 нм. С увеличением времени обработки до 60 с кристаллиты укрупнялись, длина частиц повышалась до 1350 ± 200 нм, ширина составляла 280 ± 40 нм. Дальнейшее увеличение экспозиции обработки плазмой приводило к сплавлению кристаллитов и появлению на их поверхности образований шарообразной формы средним диаметром 55 ± 15 нм.

В таблице 2 приведены результаты анализа и полуколичественного расчёта элементного состава образцов до и после модифицирования. Типичные спектры флуоресценции по каналам кальция (Ca) и фосфора (P) представлены на рисунке 2. Увеличение времени воздействия плазмы аномально тлеющего разряда приводит к повышению содержания элементов распыляемой мишени на поверхности полимера (кальция и фосфора) (рис. 2а,б). Таким

образом, шарообразные образования, возникающие на поверхности PCL при взаимодействии с плазмой в течение 150 с, которые видны на изображениях поверхности с высоким разрешением (рис. 1з), предположительно являются центрами образования и роста кальций-фосфатного покрытия. Ранее было показано, что формирование кальций-фосфатного покрытия на поверхности термопластичного полимера при ВЧМР распылении твёрдотельной мишени из гидроксиапатита происходит путём укрупнения и слияния островков фосфатов кальция [21].

В зависимости от экспозиции воздействия плазмы изменялись свойства модифицированной поверхности PCL от гидрофобной со значением свободной энергии поверхности $\gamma \sim 30$ мДж/м² до гидрофильной со значением $\gamma \sim 73$ мДж/м² (рис. 3, табл. 1). Увеличение свободной энергии поверхности в результате плазменной обработки, по-видимому, обусловлено процессами дегидрирования PCL. Аморфные твёрдые тела традиционно демонстрируют более низкие значения поверхностной энергии

Таблица 2. Содержание кальция и фосфора в исследуемых образцах.

Время модифициров. (сек)	Ca ат. (%)	Интенсив. линии (отн.ед.)	Интенсив. фона (отн.ед.)	P ат. (%)	Интенсив. линии (отн.ед.)	Интенсив. фона (отн.ед.)
0	0	–	–	0	–	–
30	$\geq 0,003$	0,108	0,137	$\geq 0,003$	0,063	0,022
60	$\leq 0,003$	0,134	0,135	$0,022\pm 0,001$	0,394	0,033
150	$0,007\pm 0,001$	0,241	0,126	$0,036\pm 0,001$	0,673	0,038

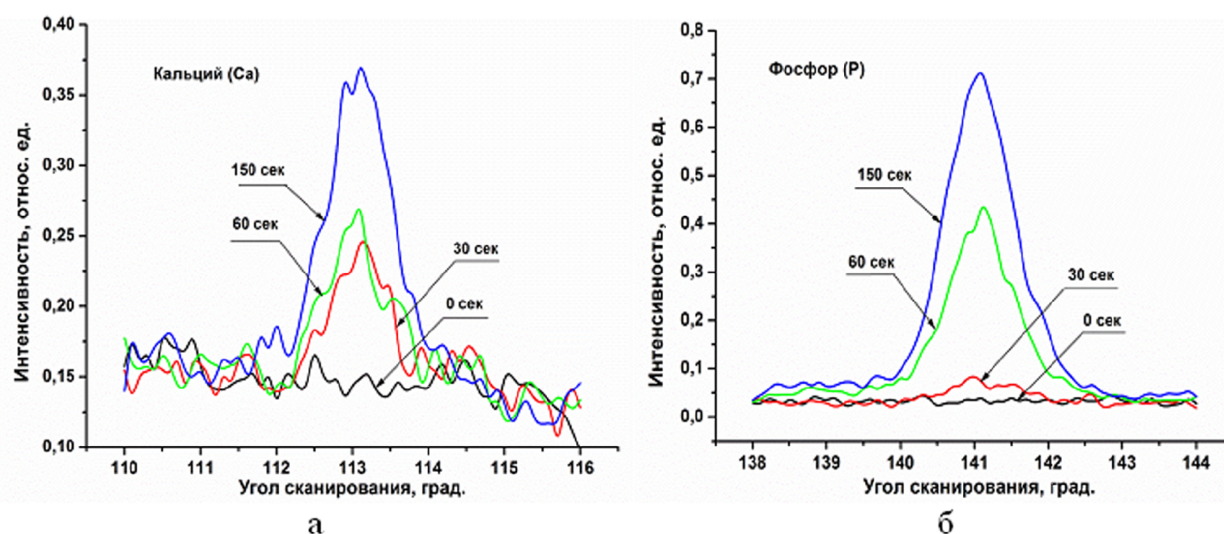


Рисунок 2. Флуоресцентные спектры исследуемых образцов поверхности PCL при различной длительности воздействия ВЧМР плазмы: а) по каналу кальция; б) по каналу фосфора.



Рисунок 3. Фотографии капли жидкостей на поверхности PCL при различной длительности воздействия ВЧМР плазмы: а) без обработки; б) 30 с; в) 60 с; г) 150 с.

по сравнению с кристаллическими, поэтому факт увеличения свободной энергии поверхности является дополнительным свидетельством наличия процессов кристаллизации PCL с образованием поверхностной структуры типа биорезорбируемый полимер/кальций-фосфатная биокерамика.

Значительное повышение полярной компоненты γ_p свободной энергии поверхности, наблюдаемое при удлинении экспозиции обработки, свидетельствует о значительном увеличении сил межмолекулярного взаимодействия на поверхности PCL. Незначительное изменение дисперсной компоненты γ_d свободной энергии поверхности говорит о слабом влиянии плазменной обработки на неполярные поверхностные свойства PCL.

Для оптимальной адгезии, миграции и дифференцировки клеток на биоматериале требуется поверхность с умеренной гидрофильностью [22]. Кроме того, придание поверхности различных материалов, в том числе полимеров, наноразмерной шероховатости стимулирует клеточную адгезию [23]. В результате плазменной модификации поликапролактона произошли изменения свойств поверхности, потенциально улучшающие взаимодействие с клетками: умеренное повышение гидрофильности и шероховатости. Оценку эффективности адгезии и клеточной жизнеспособности

после взаимодействия с поверхностью проводили на культуре ММСК КМ. Анализ фенотипа культуры ММСК КМ методом проточной цитофлуориметрии показал, что она на 98,5% состояла из CD90⁺CD45⁻ клеток. В процессе культивирования на матриксах клеточный фенотип не менялся.

Через 5 суток культивирования ММСК КМ на исследуемых образцах зарегистрировано достоверное улучшение адгезии клеток к модифицированным поверхностям (табл. 3, рис. 4). Так, общее количество ММСК КМ на контрольных образцах PCL (без модифицирования) оказалось в 5,8 раз меньше, по сравнению с поверхностями после 30-секундной обработки ВЧМР плазмой, и в 7,5 раз меньше, чем на матриксах с 60 и 150-секундной обработкой ($p < 0,05$). При этом через 5 суток количество клеток на модифицированных поверхностях (после воздействия плазмой в течение 60 с и 150 с) достоверно не отличалось от числа ММСК КМ на культуральном пластике, сформировавшихся за этот период конфлюэнтный монослой.

Следует отметить, что степень распластанности клеток отражала комфортность пребывания ММСК КМ на данных поверхностях и коррелировала как с количеством клеток на матриксах, так и с их жизнеспособностью (табл. 3, рис. 4).

Таблица 3. Результаты исследования адгезии и показателей жизнеспособности ММСК КМ на исследуемых образцах.

Время модификации (сек)	Количество ММСК КМ на 1 мм ² поверхности (Ме (25%; 75%))	Относительное число ММСК КМ, (Ме (25%; 75%))			
		Жизнеспособные (%)	Ранний апоптоз (%)	Поздний апоптоз (%)	Некроз (%)
0 (контроль 1)	111,5# (71; 166)	52,62# (52,59; 52,78)	39,3# (37,31; 41,23)	7,39# (6,0; 8,78)	0,72 (0,015; 1,13)
30	644,5*# (437; 720)	85,68* (83,65; 87,72)	13,62* (11,68; 15,55)	0,52* (0,37; 0,66)	0,18 (0,13; 0,23)
60	828,5* (749; 844)	88,98* (88,55; 89,41)	8,99* (8,38; 9,6)	1,29* (1,12; 1,45)	0,75 (0,73; 0,76)
150	833* (774; 877)	85,55* (84,5; 86,62)	13,12* (11,83; 14,4)	1,03* (0,96; 1,09)	0,3 (0,13; 0,46)
культуральный пластик (контроль 2)	816* (777; 886)	79,17* (79,0; 79,33)	20,84* (20,67; 21,0)	0*	0

Примечание: * - достоверность отличий по сравнению с контролем 1 ($p < 0,05$); # - достоверность отличий по сравнению с контролем 2 ($p < 0,05$).

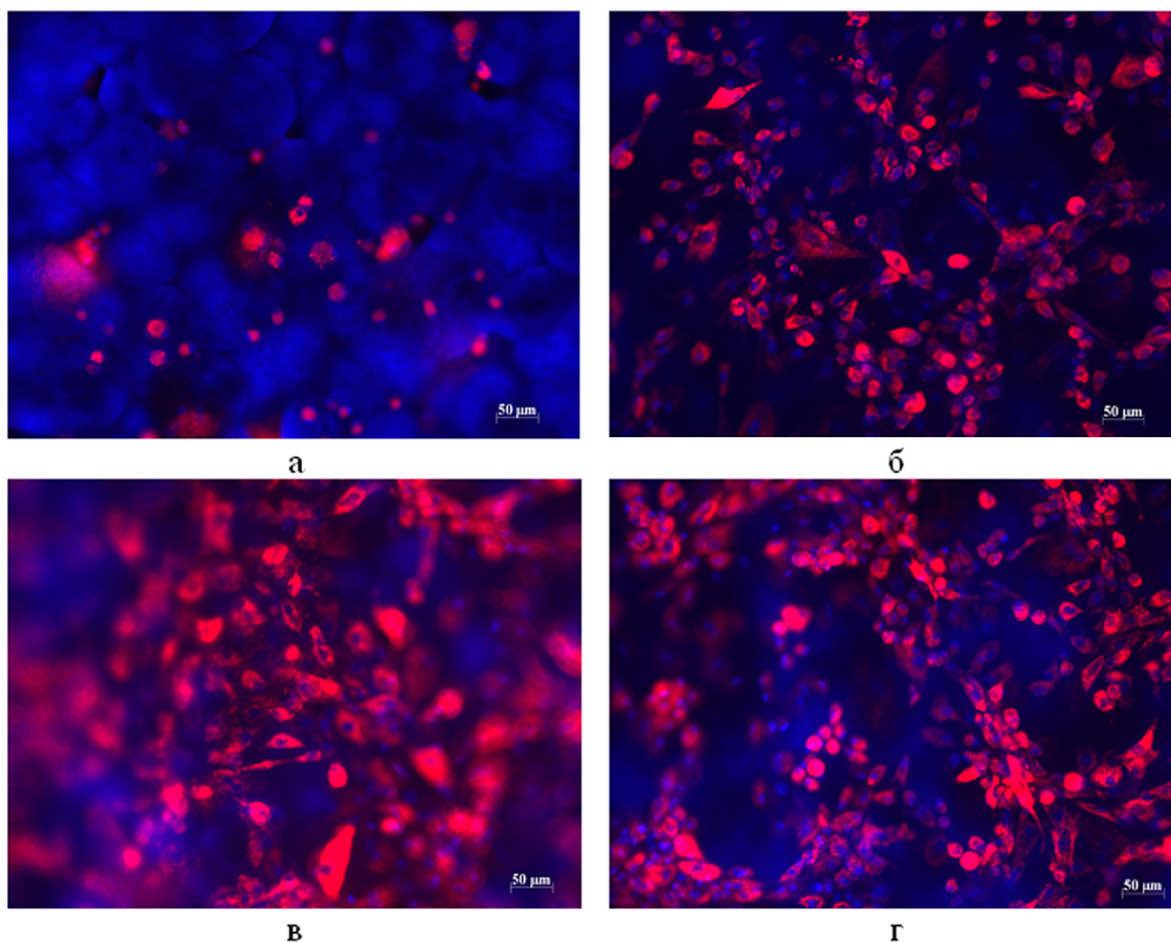


Рисунок 4. Изображения ММСК на поверхности PCL при различной длительности воздействия ВЧМР плазмы: а) без обработки; б) 30 с; в) 60 с; г) 150 с (флуоресцентная микроскопия).

Жизнеспособность ММСК КМ после 5-суточного культивирования на модифицированных матриксах из PCL (табл. 3) была в 1,6 раза выше, по сравнению с немодифицированными образцами. При этом не было выявлено достоверных различий между относительным количеством жизнеспособных ММСК КМ, снятых с модифицированной поверхности и с культурального пластика.

По сравнению с контрольным образцом PCL модифицирование поверхности полимера в течение 30 с, 60 с и 150 с приводило к снижению частоты возникновения раннего апоптоза среди ММСК КМ через 5 суток культивирования в 2,9, 4,4 и 3 раза соответственно. Экспозиция в плазме в течение 60 с оказалось наиболее выигрышной, так как данному виду плазменной обработки соответствовал максимальный уровень клеточной адгезии и клеточной жизнеспособности. При этом частота развития раннего апоптоза среди ММСК КМ была в 1,5 раза реже, чем при других режимах модификации, и в 2,3 раза реже, чем при культивировании ММСК КМ на культуральном пластике.

Развитие позднего апоптоза среди клеток, культивируемых на модифицированных поверхностях PCL, было достоверно ниже, по сравнению с контролем без модификации (в 14,2 раза ниже, чем после 30 с воздействия плазмой; в 5,7 раз ниже,

чем после 60 с воздействия плазмой; в 7,2 раза ниже, чем при 150-секундной модификации).

Хорошая клеточная адгезия, распластывание, высокая пролиферация и жизнеспособность свидетельствуют о формировании на модифицированной поверхности благоприятных условий для заселения клетками.

Инкрустированный в поверхность PCL с помощью магнетронного нано-распыления гидроксиапатит обладает отличной от основного материала скоростью деградации, поэтому дальнейшее исследование *in vivo* поможет ответить на вопрос, как повлияет нанесенный слой гидроксиапатита на скорость и характер биорезорбции полимера в организме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В работе изучена возможность модифицирования поверхности синтетического биорезорбируемого полимерного материала (поликапролактона) в плазме аномально тлеющего разряда, возникающего при высокочастотном магнетронном распылении твёрдотельной мишени, изготовленной из гидроксиапатита. Показано, что воздействие плазмы приводит к увеличению шероховатости поверхности, способствует насыщению поверхности ионами распыляемой мишени (кальцием, фосфором), увеличению свободной энергии и, как следствие,

повышению гидрофильности. Модифицирование поверхности PCL в плазме стимулировало прикрепление и последующую пролиферацию ММСК КМ и не влияло на жизнеспособность клеток (апоптоз, некроз). При этом плазменная обработка поверхности в течение 60 с была оптимальной, поскольку способствовала достижению максимальных показателей адгезии и пролиферации клеток при минимальных значениях показателей апоптоза и некроза.

Таким образом, предварительные исследования показывают потенциальную возможность использования данного метода для разработки тканеинженерных конструктов на основе биodeградируемых полимерных материалов для регенераций костной и хрящевой ткани.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00050) в Федеральном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

ЛИТЕРАТУРА

1. Nerem R.M., Sambanis A. (1995) Tissue Eng., **1**, 3-13.
2. Zhao C., Tan A., Pastorin G., Ho H.K. (2013) Biotechnol. Adv., **31**, 654-668.
3. Seal B. (2001) Mater. Sci. Eng. R Reports, **34**, 147-230.
4. Jansen J.A., von Recum A.F., van der Waerden J.P., de Groot K. (1992) Biomaterials, **13**, 959-968.
5. Burg K.J., Porter S., Kellam J.F. (2000) Biomaterials, **21**, 2347-2359.
6. Nair L.S., Laurencin C.T. (2007) Prog. Polym. Sci., **32**, 762-798.
7. Venkatraman S., Boey F., Lao L.L. (2008) Prog. Polym. Sci., **33**, 853-874.
8. Tian H., Tang Z., Zhuang X., Chen X., Jing X. (2012) Prog. Polym. Sci., **37**, 237-280.
9. Nair L.S., Laurencin C.T. (2007) Prog. Polym. Sci., **32**, 762-798.
10. Von der Mark K., Park J. (2012) Prog. Mater. Sci., **58**, 327-381.
11. Ma Z., Mao Z., Gao C. (2007) Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **60**, 137-157.
12. Siow K.S., Britcher L., Kumar S., Griesser H.J. (2006) Plasma Process. Polym., **3**, 392-418.
13. Desmet T., Morent R., De Geyter N., Leys C., Schacht E., Dubruel P. (2009) Biomacromol., **10**, 2351-2378.
14. Boyd A.R., O'Kane C., Meenan B.J. (2013) Surf. Coatings Technol., **233**, 131-139.
15. Kiryukhantsev-Korneev P.V., Pierson J.F., Kuptsov K.A., Shtansky D.V. (2014) Appl. Surf. Sci., **314**, 104-111.
16. Woodruff M.A., Huttmacher D.W. (2010) Prog. Polym. Sci., **35**, 1217-1256.
17. Kara F., Aksoy E.A., Yuksekdog Z., Hasirci N., Aksoy S. (2014) Carbohydr. Polym., **112**, 39-47.
18. Abenojar J., Martinez M.A., Encinas N., Velasco F. (2013) Int. J. Adhes. Adhes., **44**, 1-8.
19. Owens D.K., Wendt R.C. (1969) J. Appl. Polym. Sci., **13**, 1741-1747.
20. Chatani Y., Okita Y., Tadokoro H., Yamashita Y. (1969) Polym. J., **1**, 555-562.
21. Tverdohlebov S.I., Bolbasov E.N., Shesterikov E.V., Malchikhina A.I., Novikov V.A., Anissimov Y.G. (2012) Appl. Surf. Sci., **263**, 187-194.
22. Bacakova L., Filova E., Parizek M., Ruml T., Svorcik V. (2011) Biotechnol. Adv., **29**, 739-767.
23. McMurray R.J., Gadegaard N., Tsimbouri P.M., Burgess K.V., McNamara L.E., Tare R. (2011) Nat. Mater., **10**, 637-644.

Поступила: 17. 12. 2014.
Принята к печати: 22. 04. 2015.

EFFECT OF RADIO FREQUENCY DISCHARGE PLASMA ON SURFACE PROPERTIES AND BIOCOMPATIBILITY OF POLYCAPROLACTONE MATRICES

*E.N. Bolbasov¹, L.V. Antonova², V.G. Matveeva², V.A. Novikov³, E.V. Shesterikov¹,
N.L. Bogomolova¹, A.S. Golovkin², S.I. Tverdohlebov¹, O.L. Barbarash², L.S. Barbarash²*

¹National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

²Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Disease,
6 Sosnovy blvd., Kemerovo, 650002 Russia; tel.: 384-264-38-02; e-mail: antonova.la@mail.ru

³National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

Surface modification of bioresorbable polymer material (polycaprolactone, PCL) with abnormal glow discharge, initiated during radio-frequency magnetron sputtering of a hydroxyapatite target was investigated. Plasma treatment resulted in an increase of surface roughness of PCL, crystallite size, the surface free energy and hydrophilicity. Increased treatment time (30, 60, 150 seconds) provoked the polymer surface saturation with the sputtering target ions (calcium, phosphorus). The assessment of plasma exposure of PCL surface on bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells behavior (BM MSCs) has been performed. Modification of the polymer surface with the abnormal glow discharge stimulated adhesion and subsequent proliferation of BM MSCs; thus, maximum values were achieved with the surface treatment for 60 s. This type of plasma modification did not affect cell viability (apoptosis, necrosis). Thus, the surface modification with abnormal glow discharge, initiated during radio-frequency magnetron sputtering of a hydroxyapatite target, appear to be a promising method of surface modification of bioresorbable polymer material (PCL) for tissue engineering.

Key words: surface modification, polycaprolactone, roughness, free energy, hydrophilicity, biocompatibility