

Использование контейнеров и упаковочного материала с углеродсодержащим покрытием для хранения аллогенных трансплантатов

Э.Р. Мулдашев, В.У. Галимова, А.Д. Мусина

Федеральное государственное учреждение
Всероссийский Центр глазной и пластической хирургии, Уфа

Реферат

Полноценное сохранение жизнеспособных тканей и органов для успешной дальнейшей пересадки является актуальной проблемой современной трансплантологии.

Различные упаковочные материалы и системы, применяемые в биологии, медицине и изготовленные из синтетических полимерных материалов, должны обладать определенным комплексом свойств, в том числе: биосовместимостью, асептическими свойствами, антибактериальной активностью, при необходимости - обеспечивающими феномен биоэпитаксии. Эти качества могут быть обеспечены путем наноструктурирования и модифицирования поверхности материалов.

Поэтому, разрабатывая данную проблему на базе Тканевого банка Всероссийского центра глазной и пластической хирургии (г. Уфа), мы обратились к достижениям современных нанотехнологий. В рамках совместного проекта с кафедрой наукоемких технологий МАТИ и радиоэлектроники МГУ нами были отработаны различные технологии получения НСП (наноструктурированной поверхности) с различными физико-химическими свойствами. Полученные результаты позволили первоначально создать контейнер для асептического хранения контактных и интраокулярных линз. Предварительные исследования показали, что контейнеры с асептической НСП могут также длительно поддерживать жизнеспособность донорских тканей, в том числе, донорской роговицы.

Ключевые слова: трансплантология, нанотехнологии, наноструктурированные поверхности, асептическое хранение, аллогенные трансплантаты.

Введение

Такие черты современности, как урбанизация, возникновение новых мегаполисов, повышенная опасность и вероятность техногенных катастроф, требуют модернизации служб здравоохранения. Работа современных многопрофильных Тканевых Банков, которые бы обеспечивали необходимым количеством качественного донорского материала, особенно на случаи массовых urgentных

операций, является главным условием развития трансплантологии и пластической хирургии. Известно, что одним из перспективных направлений современной хирургии является трансплантация тканей (Шумаков В.И., Коваленко П.П.). Достижения в области физики, химии, биологии, медицины, инженерии, компьютеризации и математического моделирования диктуют все новые требования к качеству трансплантата, что отчасти объясняет существование множества способов сохранения донорского материала. В последнее время мы наблюдаем за успехами в области нанотехнологий, возникших и развивающихся на стыке наук. Применение нанотехнологий в медицинской и клинической практике, кроме познаний в области физиологии клеточных мембран, молекулярной биологии, регенеративной медицины, требует фундаментальных знаний, например, в материаловедении, химическом синтезе.

Итак, полноценное сохранение жизнеспособных тканей и органов для успешной дальнейшей пересадки является актуальной проблемой современной трансплантологии. Методы, используемые современными тканевыми банками: низкотемпературная криоконсервация, силиконовысушивание, хранение в питательных средах и другие (Филатов В.П., Ерошевский Т.И., Коваленко П.П., В. McCarey, Н. Kaufman, Волков В.В., Травкин А.Г., Дронов М.М.), не всегда позволяют достигать длительного сохранения биопластических свойств аллогенных трансплантатов. Консервация донорских тканей и органов, обеспечивающая снижение метаболических, ферментативных аутолитических процессов и сохранение изолированных тканей и органов в состоянии структурной целостности и жизнеспособности – достаточно трудная задача, и поиск более совершенного метода консервации продолжается.

Тенденция использования средств разового применения в современной медицине, продиктованная достижениями научно-технического прогресса и санитарно-гигиеническими требованиями, связана с широким применением в медицине различных полимеров. Однако, как не парадоксально, широкое применение различных полимеров, от части – в гигиенических целях, стало причиной возникновения другой, не менее опасной проблемы заболеваемости

инфекциями, вызванными микробами, происходящими из биопленок, непременно образующихся на поверхности любых полимеров, и стала настолько угрожающей, что выделен класс заболеваний «вызванных микробами биопленки». Для обеспечения биосовместимости различных изделий из полимерных материалов с живыми тканями, а также с целью предупреждения образования биопленки на них, в конце 90-х годов в медицине начали применяться различные способы модификации поверхности полимеров, в частности – наномодифицирование поверхностей с помощью нанесения углеродсодержащих покрытий: алмазоподобных, нанотрубы, фуллеренсодержащих, карбиновых.

Различные упаковочные материалы и системы, применяемые в биологии, медицине и изготовленные из синтетических полимерных материалов, должны обладать определенным комплексом свойств, в том числе: биосовместимостью, асептическими свойствами, антибактериальной активностью, при необходимости - обеспечивающими феномен биоэпитаксии. Эти качества могут быть обеспечены путем наноструктурирования и модифицирования поверхности материалов.

Поэтому, разрабатывая данную проблему на базе Тканевого банка Всероссийского Центра глазной и пластической хирургии (г. Уфа), мы обратились к достижениям современных нанотехнологий. В рамках совместного проекта с кафедрой наукоемких технологий МАТИ и радиоэлектроники МГУ нами были отработаны различные технологии получения НСП (наноструктурированной поверхности) с различными физико-химическими свойствами. Полученные результаты позволили первоначально создать контейнер для асептического хранения контактных и интраокулярных линз (Российский патент № 2120807; 27.10.1998г., А.Д. Мусина).

Предварительные исследования показали, что контейнеры с асептической НСП могут также длительно поддерживать жизнеспособность донорских тканей, в том числе, донорской роговицы.

Цель исследования

Совершенствование способа длительной консервации аллогенных трансплантатов путем создания контейнеров и пленочных упаковочных материалов с наноструктурированным углеродсодержащим покрытием для их хранения.

Задачи исследования

1. Изучить основные физико-химические характеристики асептических углеродсодержащих покрытий с целью создания специального контейнера и упаковочного материала для хранения донорских тканей.
2. Изучить антибактериальные и адгезивные свойства наноструктурированных покрытий и провести тесты на их токсичность.
3. Разработать специальные контейнеры и упаковочные пленки с наноструктурированным покрытием для хранения донорских тканей.
4. Провести сравнительный морфологический анализ нативных трансплантатов на примере донорской роговицы при различных способах консервации.
5. Оптимизировать параметры системы: донорская роговица – наноструктурированная поверхность – питательная среда.

Материалы и методы

Методы физико-химических исследований характеристик асептических биосовместимых углеродсодержащих покрытий на поверхности полимерных материалов (ИК-спектроскопия, рентген-фотоэлектронная спектроскопия, электронная спектроскопия для химического анализа (ЭСХА); исследования электростатических свойств, топология наномодифицированной поверхности). Исследовались процессы формирования НСП на полимерных материалах: ПЭТФ, ПТФЭ и ПВХДФ, их модифицированные поверхностные характеристики и возможности управления ими. Выбор данных полимеров определялся как широким использованием указанных материалов, так и возможностью обеспечения большого диапазона свойств при модифицировании образован-

ных поверхностей, поскольку ПЭТФ обладает высокоэнергетической полярной поверхностью, а ПТФЭ обладает малыми значениями диэлектрической проницаемости и диэлектрических потерь, низкоэнергетической неполярной поверхностью, а также широким рабочим температурным диапазоном.

НСП на основе ПЭТФ, ПТФЭ, ПВДФ формировалась обработкой исходной поверхности потоками ионов химически активных и инертных газов и их смесей (CF₄, Ar, O₂). Модифицирование сформированных НСП производилось двумя путями: нанесением пленок углерода толщиной 5–120 нм из направленных ионно-плазменных потоков паров углеводородов и магнетронным нанесением высокопористых пленок. В первом случае возможно управление свойствами поверхности за счет управления фазовым и кластерным составом пленки, числом слоев и толщиной слоя при отношении реальной поверхности к геометрической в интервале 8–10; а во втором случае это отношение увеличивается в 100 раз.

Исследовалось влияния предварительной обработки полимерной поверхности пучком ионов азота и кислорода на состав поверхности и ее физико-химические свойства. Для определения изменения химической структуры поверхности проводились исследования химического состава наноразмерного покрытия на основе углерода, сформированного ионно-плазменными методами на поверхности обрабатываемого материала упаковочного пленчатого материала и специального контейнера, это: ИК-спектроскопия, рентген-фотозлектронная спектроскопия, электронная спектроскопия для химического анализа (ЭСХА).

Измерение заряда поверхности производилось методом динамического конденсатора. Измерение абсолютной величины электростатического потенциала производилось с помощью киловольтметра С 95.

Для топологических исследований структуры НСП использовался атомно-силовой микроскоп «ФемтоСкан» с максимальным полем сканирования 10 x 10 мкм. Для каждого из образцов были получены снимки поверхности в разных точках и при различном увеличении. Основными определяе-

мыми параметрами являлись: характерный горизонтальный размер – r , периметр – L , объем – V особенностей рельефа поверхности, шероховатость поверхности (среднеквадратичное отклонение – Rq), площадь участка поверхности – S , а также фрактальная размерность – DF .

Для изучения характеристик поверхности образцов использовали также гониометрический способ измерения контактных углов смачивания (θ). Рабочими жидкостями служили вода (бидистиллят) и глицерин (химически чистый). Значения контактных углов получали как среднестатистические из 5-ти экспериментов по 10 измерениям. На основании полученных данных рассчитывали величины полной поверхностной энергии (γ), полярного (γ^P) и дисперсионного компонентов (γ^d). Для расчетов использовали величины работы адгезии, полученные на основании экспериментальных значений краевых углов смачивания и формулы Дюпре-Юнга применительно к двум жидкостям.

Методы исследования антимикробной активности углеродсодержащих пленок и их токсикология. Исследование антимикробной активности углеродсодержащих пленок. Методы исследования адгезивных свойств углеродсодержащих покрытий. Исследование антимикробной активности алмазоподобных и карбиносодержащих пленок было проведено по стандартной методике методом аппликации испытуемых образцов на зараженную микроорганизмами поверхность мясопептонного агара в чашках Петри. Пластины кремния, покрытые алмазоподобными и карбиносодержащими пленками, использовали как субстраты для культивирования эмбриональных фибробластов мыши. Нанесенные углеродные пленки имели различные значения зарядовых характеристик поверхности, контактного угла смачивания, рельефа и состава поверхности. Изучалась взаимосвязь между данными исследований зарядовых свойств поверхности и данными исследования степени адгезивности клеток соединительной ткани (эмбриональных фибробластов мыши).

При исследовании антибактериальная активность испытуемых наномодифицированных углеродсодержащими покрытиями образцов оценивалась по стандартной методике “in vitro”.

Для этого использовали музейные штаммы грамположительного (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) и грамотрицательного (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) микроорганизмов. Суспендировали 3–4 колонии 18–20 часовой культуры исследуемых микроорганизмов в 3 мл физиологического раствора. Полученную суспензию доводили до стандарта мутности 0,5 по шкале McFarland ($1,5 \cdot 10^8$ кое/мл). Базовую суспензию разводили в физиологическом растворе методом серийных разведений до концентрации 15 кое/мл. Бактерицидное покрытие разрезали на фрагменты размером 1,5 x 1,5 см. По одному фрагменту каждого вида поместили в пробирку с жидкой питательной средой (контроль стерильности покрытий). В качестве питательной среды использовался бульон Мюллер-Хинтон. Из каждой пробирки с различной концентрацией кое/мл забирали дозатором по 25 мкл суспензии микроорганизма и наносили на отдельный фрагмент полимерной подложки с покрытием, а также на простую подложку для контроля роста культур. Зараженные таким образом фрагменты покрытий инкубировали во влажной среде в термостате 2 часа при 37°C. После инкубации фрагменты помещали в пробирки с 4 мл питательной среды и ставили в термостат. Пробирки инкубировались при 37°C в течение 48 часов. Бактерицидную активность оценивали по наличию видимого роста в пробирках с питательной средой на 2-е сутки инкубации.

Эффективность образцов условно определяли по «трем степеням».

Санитарно-химические испытания проводились на содержание восстановительных примесей, определяемых по расходу 0,02 Н раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; на содержание органических примесей, определяемых по показателю оптической плотности в области длин волн 220 нм, а также на содержание металлов таких, как Cd, Pb, Sn, Cu, Cr, Ba.

Адгезивность «in vitro» в отношении культивируемых клеток, эмбриональных фибробластов мыши, исследовались следующим образом: субстраты обрабатывали 96 % этанолом, промывали дистиллированной водой и после высушивания помещали в культуральные чашки. Чашки с субстратами стерилизовали УФ в течение 1 часа. Клетки суспендировали в культуральной

среде 199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков. Клетки культивировали в течение трех суток при температуре 37°C в атмосфере воздуха с 5 % CO₂. По окончании культивирования клетки фиксировали 2 % раствором глутарового альдегида, промывали в воде и высушивали; часть препаратов окрашивали 1 % раствором метиленовой сини. Препараты изучали с помощью световой и стереомикроскопии.

Эксперимент «in vivo» проводился следующим образом: пластинки фторопласта (0,6 x 2 см²), покрытые углеродными пленками, в стерильных условиях имплантировали подкожно мышам линии СВА x С57В1 (по одной пластинке в оба бока). Через 4 месяца после операции имплантации, пластинки с образовавшимися вокруг них капсулами извлекали и фиксировали в 10 % нейтральном формалине. Из пластинок с капсулами готовили гистологические препараты по стандартной методике; серийные срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Препараты исследовали с помощью световой микроскопии.

Морфологические исследования донорского материала роговицы в эксперименте в зависимости от способа хранения донорской роговицы, типа консервирующей среды, длительности и температуры хранения донорской роговицы. Для проведения морфологических исследований корнеосклеральные диски были иссечены и хранились в органной культуре по методике соответствующей стандартам Тканевых Банков. Диски иссекались после обработки целого глазного яблока: четырехкратное промывание глазного яблока в стерильном 0.9% [wt/vol] NaCl, затем его погружение в 5% раствор йода поливинилпирролидона, после чего глазное яблоко обрабатывается 2% тиосульфатом натрия (для нейтрализации) и вновь помещается в раствор 0.9% [wt/vol] NaCl . Корнеосклеральные диски помещались в специальные контейнеры для хранения донорской роговицы, контейнеры за внешний выступ подвешивались на нити 5/0 Mersilk (Ethicon, ААН, Bristol, UK) и помещались в стеклянный флакон емкостью 120 ml, с 100 ml консервирующей среды. Консервирующими средами были выбраны Eagle's minimum essential medium (MEM), Optisol, Dexol (среда McCarey-Kaufman), плазма крови донора. Донор-

ские роговицы хранились в стандартном инкубаторе, при 27°C , время хранения варьировало до 30 дней, без замены консервирующей среды.

Исследование эндотелия. После определенного времени хранения донорской роговицы, плотность эндотелиальных клеток и их жизнеспособность определялись в зоне площадью 1.54 mm² , используя фазово-контрастный световой микроскоп. Роговичный эндотелий окрашивался в 45% растворе трипанового синего (Sigma, UK). Окрашивание длилось 1 минуту, после чего проводились подсчет числа некротизированных клеток и определение характера их распределения. После промывания в стерильном 0.9% (wt/vol) NaCl, был использован гипотонический раствор 1.8% sucrose для визуализации границ клеток. Число клеток в центральной зоне роговичного эндотелия определялось на площади в квадратный миллиметр, используя eueriese graticule калибровку на микроскопе, учитывался градус-степень складки. Качество эндотелия оценивалось по степени от 1 до 5, соответственно возрастающему критерию, по таким критериям, как: форма клетки, ее границы и размеры. Форма клетки оценивалась по 4-х бальной шкале: от 1 – гексагональной до 4 – полиморфизм; границы клетки: от 1 – четкие границы без нарушения их целостности до 4- частичная потеря границ клеток и их полное отсутствие; размеры клетки: от 1 – плоские без признаков отека клетки до 4 – разбухших ЭК; апикальная поверхность ЭК, с пиноцитозными пузырьками: 1 – 0% пузырьков-отверстий, 2 – 10-20% пузырьков, 3 – 40-50% пузырьков, 4 – 70-100% пузырьков. Просуммировав эти изменения, мы выделили 4 основные группы оценки морфологического состояния ЭК: 1 – неизмененные ЭК до 4 – деструктурированные ЭК. Исследовано было 20 кадаверных глаз, которые хранились разными способами консервации: во влажной камере, в среде Eagle's, в специальных контейнерах с разными средами (Optisol, Dexol, плазма крови донора). После этого исследования корнеосклеральные диски немедленно помещались в 10% раствор нейтрального буферного формалина и хранились при 4°C.

Для изучения тканей в электронном микроскопе, позволяющем вы-

явить ультраструктуру клеток и их компонентов, применяют методы фиксации (обычно с использованием осмиевой кислоты и глутаральдегида) и среды для заливки (обычно эпоксидные смолы). Специальный ультрамикротом со стеклянным или алмазным ножом позволяет получать срезы толщиной менее 1 мкм, а постоянные препараты монтируют не на предметных стеклах, а на медных сеточках.

Для проведения электронно-микроскопических исследований кусочки роговичной ткани кадаверных глаз размером 1-2 мм, служили препаратом, подготавливались к работе, последовательно обрабатываясь в 2,5% глутаральдегиде (30 минут), в 2,5% растворе осмиевой кислоты, в фосфатном буфере по Колфилду (2 часа при pH=7,4). После чего они промывались фосфатным буфером и помещались в урацил ацетат с 70% спиртом (24 часа). Затем в спиртах восходящей концентрации и в ацетоне препарат обезвоживался и заливался смесью эпона с аралдитом; при этом использовался оригинальный метод заливки роговичной ткани, предложенный Илатовской Л.В. (1980). Для определения необходимого для исследования участка ткани, а также для ориентировки в слоях препарата, делались срезы, которые окрашивались (метиленовым синим, гематоксилином, толуидиновым синим). На нужном участке ткани, выбранном под световым микроскопом, на микротоме делались ультратонкие срезы, которые контрастировались (например: свинцом по Рейнольдсу). Морфологические исследования проводились при увеличении x200 и x500, в группах исследуемого донорского материала, отличающихся: способом хранения жизнеспособной донорской роговицы, типом консервирующей среды, длительностью и температурой хранения донорской роговицы. Сравнивались такие способы хранения донорской роговицы, как: способ хранения во влажной камере по Филатову, в питательной среде Eagle's, хранение в специальном контейнере, в разных консервирующих средах. Консервирующими средами были выбраны Optisol, Dextol (среда McCarey-Kaufman), плазма крови донора.

Результаты и обсуждение

Исследование заряда на НСП и возможность регулирования его величины и направления дают возможность предполагать о перспективности использования этого свойства не только при обработке пластмассовых контейнеров для асептического хранения контактных, интраокулярных линз и при изготовлении специальных контейнеров для хранения жизнеспособной донорской роговицы, аллоплантов а также для создания модифицированных поверхностей в медицине будущего.

Состав и физико-химические свойства поверхности являются важным моментом при формировании НСП и зависят от поставленных исследователями и технологами задач. Исследование антибактериальной активности НСП были нашими первыми исследованиями на пути преодоления формирования биопленки на поверхности полимера и достижения биосовместимости с окружающими тканями. Биосовместимая НСП предполагает определенный химический состав, атомную структуру, заряд на поверхности и способна обеспечивать эффект поляризации клеточных мембран, форму и функционирование клеток живых тканей когда они находятся в контакте с НСП–interface взаимодействии (например: бессосудистая структура роговичной ткани – НСП) (A.D. Moussina, 2002).

Так, ИК-спектроскопия указывает на то, что синтезированное из ионного пучка наноразмерное покрытие на основе углерода имеет неоднородную структуру, включающую линейные цепи $(\text{CH}_2)_n$ и шестичленные кольца $(\text{CH}_2)_6$, содержащие в своем составе кетонные группы, а также аморфный углерод α -C. Результаты по исследованию состава пленок на основе углерода при обработке полимеров потоком ионов аргона показали отсутствие кетонных групп, что приводило к большей вероятности получения биосовместимых материалов. В случае обработки в воздушной смеси и нанесения пленки углерода появлялись антибактериальные свойства.

Электростатические исследования углеродсодержащих пленок показали что, предварительная обработка поверхности полимеров, толщина покры-

тия, энергия частиц существенно влияют на изменение заряда поверхности полимеров. В процессе нанесения углеродного слоя пленки ПТФЭ, ПЭТФ, ПВДФ приобретают избыточный положительный заряд порядка до нескольких мкКл/м². Предварительная обработка поверхности пленки ПЭТФ, ПТФЭ, ПВДФ в смесях Ag + O и воздушной приводит к более эффективной зарядке поверхности образца в сравнении с обработкой в плазме CF₄. Исследование электрофизических свойств поверхности полимеров после обработки и последующего нанесения углеродных пленок позволило выявить некоторые особенности образования и роста пленок на поверхности полимеров с различной структурой поверхности. Показана также возможность влияния на электрические свойства полимеров путем наноструктурирования их поверхности.

Проведенные топографические исследования (АСМ) наноструктурированной поверхности показали, что после предварительной обработки образцов ПЭТФ, ПТФЭ, ПВДФ и после нанесения на их поверхность покрытий, в первый момент времени, происходит сглаживание микронеровностей поверхности (шероховатость уменьшается). Далее, с ростом толщины пленки, высота неровностей начинает увеличиваться, причем диаметр конгломератов почти не изменяется, однако, при достижении некоторой толщины покрытия размер характерных особенностей рельефа увеличивается. Предварительная обработка поверхности подложки с помощью CF₄ приводит к развитию рельефа. После достаточно длительной обработки поверхность, после нанесения покрытия, имеет большую шероховатость, чем без предварительной обработки. Увеличение длительности предварительной обработки увеличивает шероховатость поверхности, получаемой уже после осаждения покрытия. Шероховатость поверхности при этом увеличивается почти в 100 раз по сравнению с пленкой, наносимой без предварительной обработки. Все эти изменения в структуре поверхности вызывают однозначное изменение фрактальной размерности. В дальнейшем, при проведении исследований асептических свойств НСП и ее биосовместимости, было установлено, что наибольшая бактерицидная активность проявляется у образцов с максимально развитым ре-

льефом (отношение реальной площади к геометрической ~ 100). Корреляция результатов исследования заряда и внимательный анализ данных позволяют утверждать, что взаимодействие НСП с микроорганизмами протекает, по-видимому, по двум механизмам, причем один из них связан с электростатическим взаимодействием, когда реальная поверхность может быть увеличена в 5-8 раз, а заряд достигает единиц мкКл/м²; интенсивность второго механизма связана со степенью дисперсности НСП.

Таким образом, физико-химические свойства НСП позволили определить оптимальные параметры характеристик углеродсодержащих пленок для получения специальных контейнеров и упаковочных пленок, обработанных асептическими биосовместимыми покрытиями. Толщина наносимых на поверхность пленок варьирует от 5 до 120 нм, и зависит как от материала подложки (ПЭТФ, ПТФЭ, ПВДФ), так и от заданных свойств готового изделия. Нанесение пленки из C₆H₁₂ уменьшает заряд на поверхности пленок, а с увеличением содержания N (азота) в газовой смеси – приводит к увеличению заряда НСП. Предварительная обработка поверхности, например, с помощью SF₄, приводит к развитию рельефа, а предварительная обработка поверхности пучками ионов O₂ и N – к разрушению карбонильных связей с формированием гидрофобной поверхности. То есть технологический режим нанесения углеродсодержащих пленок с НСП определяется заданными свойствами поверхности асептического биосовместимого специального контейнера или упаковочной пленки.

Разработка специальных контейнеров и упаковочных пленок с наноструктурированным покрытием для хранения донорских тканей. При разработке специального контейнера для асептического хранения и транспортировки нативных тканей, донорской роговицы, помимо антибактериальных, определенных барьерных свойств, обнаруженных ранее, в ходе экспериментальных и клинических исследований, выявлены были и другие свойства наномодифицированной поверхности полимера, полученной с помощью нанесения углеродсодержащего покрытия (УП), например: моделирование электростатичес-

ких свойств поверхности полимера формирующего интерфейс с подлежащей биологической тканевой структурой. Это позволило приступить к разработке способа консервации жизнеспособной донорской ткани, созданием условий длительного хранения максимально приближенных к физиологическим.

Специальный контейнер для хранения и транспортировки жизнеспособной роговицы изготовлен из ПВДФ, способом прессования, имеет чашеобразную форму (форму корнеосклеральной контактной линзы), диаметром 17 мм, толщиной 0,3 мм, с модифицированной НСП. Торсионный край формы контейнера сформирован таким образом, что угол, образующийся между внутренней сферической поверхностью контейнера и внутренним выступом торсионного края, служит пазом для края донорской роговицы помещаемой в контейнер, а наружный выступ торсионного края контейнера служит для фиксации контейнера во флаконе с консервирующей средой.

Донорские роговицы иссеченные с 3-4 мм склеральным ободком помещаются в специальные контейнеры. Модифицирование поверхности специального контейнера может производиться двумя способами: нанесением пленок углерода толщиной 5-120 нм из направленных ионно-плазменных потоков паров углеводородов (V.M. Elinson, V.V. Sleptsov, A.N. Laymin, V.V. Potraysay, L.N. Kostuychenko, A.D. Moussina, 1999; V.V. Sleptsov, V.M. Elinson, N.V. Simakina, A.N. Laymin, I.V. Tsygankov, A.A. Kivaev, A.D. Moussina, 1996) и магнетронным нанесением высокопористых пленок (В.Т. Гринченко, В.В. Слепцов, С.А. Федоров, 1988). В первом случае возможно управление свойствами поверхности за счет управления фазовым и кластерным составом пленки, числом слоев и толщиной слоя при отношении реальной поверхности к геометрической в интервале 8-10; а во втором случае это отношение увеличивается в 100 раз.

Специальный контейнер прошивается через наружный торсионный выступ подвешивающей нитью. Донорская роговица аккуратно укладывается в контейнер, который затем помещается во флакон емкостью 120 мм, содержащий 100 мм консервирующей среды. Стерильно закрытые флаконы помещаются в шкафы для хранения, при температуре 27-28С (Мусина А.Д., 2000; 2005).

Результаты исследования антимикробной активности углеродсодержащих пленок и их токсикология. Результаты исследования адгезивных свойств углеродсодержащих покрытий. Экспериментальные результаты исследований антибактериальной активности наноструктурированных углеродсодержащих пленок представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты экспериментальных исследований антимикробной активности наноструктурированных углеродсодержащих клеток.

№	Полимер / условия нанесения	Индикатор м/о	Иннокуляционная доза (КОЕ/ml)				
			105	104	103	102	10
1	PTFE: 1)обработан CF4 2) α -C:H (50 нм) 3)Al (расп. из фольги)	Ps. aerug.	+	+	+	±	±
		S. aureus	+	+	±	-	-
2	PTFE, гладкий: 1) α -C:H (50 нм) 2)Al (расп. из фольги)	Ps. aerug.	+	+	+	+	+
		S. aureus	+	+	+	+	+
3	PTFE: 1)обработан CF4 2) α -C:H (50 нм)	Ps. aerug.	+	+	+	+	+
		S. aureus	+	+	+	+	+
4	PTFE гладкий: α -C:H (50 нм)	Ps. aerug.	+	+	+	+	+
		S. aureus	+	+	+	+	+
5	PTFE: 1)обработан CF4 2) α -C:H (10 нм)	Ps. aerug.	+	+	+	+	+
		S. aureus	+	+	+	+	+
6	PTFE гладкий 1) α -C:H (10 нм)	Ps. aerug.	+	+	+	+	+
		S. aureus	+	+	±	-	-
7	PTFE: обработан CF4	Ps. aerug.	+	+	+	+	+
		S. aureus	+	-	-	-	-
8	PET(рельеф+ Al) 1)"R" /возд.1/ 2)"R" / α -C:H 10 нм	Ps. aerug.	+	+	+	+	+
		S. aureus	+	+	+	+	+
9	PET(рельеф+ Al) 1)"R" /возд.1/ 2)"R" / α -C:H 50 нм	Ps. aerug.	+	+	+	+	+
		S. aureus	+	+	-	-	-
10	PET(рельеф+ Al/Al ₂ O ₃) 1)"R" /возд.1/ 2)"R" / α -C:H 50 нм	Ps. aerug.	+	+	+	+	+
		S. aureus	-	-	-	-	-

11	PET(рельеф+ Al/Al ₂ O ₃) 1) "R" /возд.3/ 2) "R" /α-C:H 50 нм	Ps. aerug.	+	+	+	-	-
		S. aureus	+	-	-	-	-
12	PET(рельеф+ Al/Al ₂ O ₃) 1) "R" /возд.3/ 2) "R" /α-C:H 100 нм	Ps. aerug.	+	+	-	-	-
		S. aureus	+	-	-	-	-
13	PET(рельеф+ Al/Al ₂ O ₃) 1) "R" /возд.1,5/ 2) "R" /α-C:H (30+20) нм	Ps. aerug.	+	+	±	±	-
14	PET 1) "R" / CF4 2) "R" /α-C:H 30 нм	Ps. aerug.	+	+	+	-	-
15	PET 1) "R" /возд.1,5/ 2) "R" /α-C:H 40 нм	Ps. aerug.	+	-	-	-	-
16	PET: "R" /α-C:H 40 нм	Ps. aerug.	+	+	+	+	-
17	PET 1) "R" /возд.1,5/ 2) "R" /α-C:H (20+ нм	Ps. aerug.	+	+	+	+	+

Анализ таблицы показывает, что наибольшая бактерицидная активность проявляется у образцов с максимально развитым рельефом (отношение реальной площади к геометрической ~ 100). Корреляция результатов исследования заряда и внимательный анализ данных позволяют утверждать, что взаимодействие НСП с микроорганизмами протекает, по-видимому, по двум механизмам, причем один из них связан с электростатическим взаимодействием, а интенсивность второго механизма связана со степенью дисперсности НСП. Основными факторами, влияющими на антибактериальную активность изделий с углеродными покрытиями, являются: состав и структура исходного соединения, условия и метод формирования пленок, состав материала и вид изделия.

Результаты исследования адгезивных свойств углеродсодержащих покрытий В таблице 2 представлены результаты по адгезивности эмбриональных фибробластов мыши на гладком ПЭТФ и мембранах на основе ПЭТФ при нанесении пленок различными методами в различных условиях.

Таблица 2. Адгезивность для клеток соединительной ткани (фибробластов мыши) углеродных пленок, нанесенных на ПЭТФ различными методами.

№	Подложка	Метод нанесения	Условия нанесения	Среднее число клеток на $S=0,6 \text{ мм}^2$	Содержание слабо-распластанных клеток, %	(Ф)/В, $\pm 25\%$
1	Покровное стекло (контроль)	-	-	300,0	5	-
2	ПТЭФ ТМ	2	C_6H_{12}	11,0	51,6	1200
3	ПЭТФ, 0,1 мм	2	C_6H_{12} , $dC=0,5 \text{ мкм}$	13,2	27,2	1300
4	ПЭТФ, 0,1 мм	2	C_6H_{12}	15,2	75,9	1500
5	ПЭТФ, 0,1 мм	1	$C_6H_{12+N_2}$ _{3 1}	34,6	13,6	30
6	ПЭТФ, 0,1 мм без покрытия (контроль)	-	-	46,5	14,6	10
7	ПЭТФ, 0,1 мм	1	C_6H_{12}	82,7	76,7	5
8	ПЭТФ, 0,1 мм	1	$C_6H_{12+N_2}$ _{1 1}	92,4	29,6	0
9	ПЭТФ, 0,1 мм	1	C_6H_{12}	189,4	35,3	5
10	ПЭТФ, 0,1 мм	2	C_6H_{12} , $d>3 \text{ мкм}$	196,7	12,2	~100

Представлено среднее число клеток и процентное содержание слабо-распластанных клеток, к которым относили клетки с сильно редуцированной цитоплазмой. Общее число прикрепившихся (как распластанных, так и

слабо- или нераспластанных) характеризует адгезивные свойства материала его способность относительно прочно связывать клетки, осевшие из взвеси на поверхность материала. Процентное содержание клеток, достигших достаточно выраженного распластывания, характеризует комплекс свойств данного материала: адгезивность для клетки, способность связывать определенные белки из сыворотки, характер микрорельефа поверхности, а также отсутствие цитотоксичности (препятствующей распластыванию клеток и вызывающей их последующую гибель). Результаты указывают также на то, что чем меньше ϕ (значение электростатического потенциала), тем выше адгезивность для клеток, при этом, процентное содержание слабораспластанных клеток не изменяется монотонно в соответствии с зарядовой закономерностью. Основными факторами в этом случае являются структура и состав поверхности.

При исследовании адгезивных свойств, результаты эксперимента «in vivo» с имплантацией УП показали, что спустя 4 месяца после имплантации вокруг пластинок с НСП сформировалась соединительнотканная капсула, что

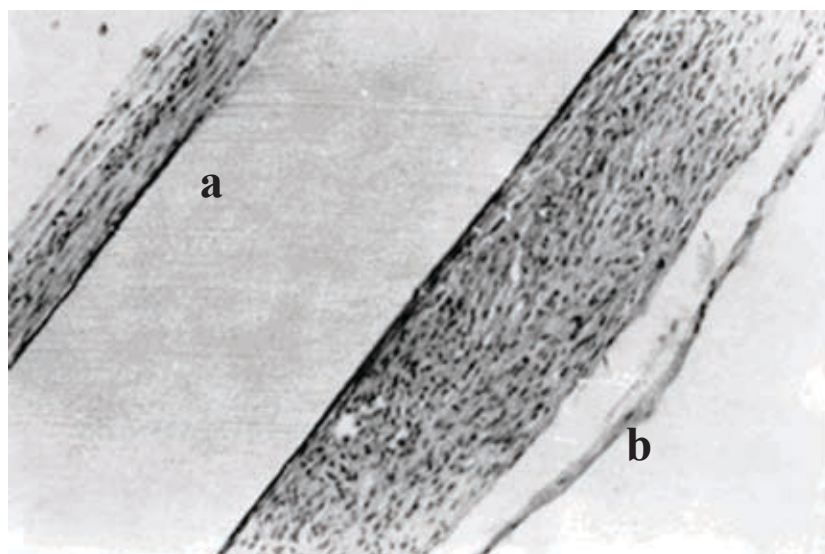


Рис. 1. Капсула, образовавшаяся вокруг пластинки из фторопласта, покрытой углеродной пленкой, спустя 4 месяца после подкожной имплантации мышцы. Тонкие (a) и многослойные (b) участки капсулы. Увеличение X60

является стандартной реакцией на биосовместимость имплантата, её толщина вокруг одной и той же пластинки значительно варьировала: в отдельных участках капсула была тонкой (не более 2 - 4 рядов клеток), в других местах выглядела многослойной (рис. 1). Тонкие участки капсулы состояли из молодых малодифференцированных фибробластов, иногда непосредственно соприкасающихся с поверхностью пластинки; между клетками определялись

тонкие коллагеновые волокна. В толстых участках капсулы можно было различить три слоя: внутренний (примыкающий непосредственно к пластинке), морфологически сходной с описанными выше тонкими участками капсулы; средний слой, состоящий из зрелых фибробластов и коллагеновых волокон, ориентированных параллельно поверхности пластинки; наружный слой, состоящий из фибробластов разной степени зрелости и рыхло расположенных коллагеновых волокон. Ни в одном случае не наблюдалось лейкоцитарной инфильтрации, что указывает на отсутствие воспалительной реакции.

Описанная морфологическая картина строения капсула была сходной у всех имплантированных пластинок.

Экспериментальные исследования, проведенные на ПЭТФ, ПТФЭ, ПВДФ с НСП, сформированной методами ионно-плазменной технологии, показали, что степень дисперсности поверхности и способ ее модифицирования определяет наличие и эффективность поверхностных характеристик, в частности, биосовместимости, антибактериальной активности, отсутствия токсичности, развитой поверхности с хорошими адгезивными свойствами для клеток. При исследовании наноструктурированной поверхности (НСП) были открыты такие феномены, как: слежение, исправление, конструирование и контроль над биологическими системами на молекулярном уровне. Все природные материалы и системы построены из нанообъектов. Именно в интервале наноразмеров, на молекулярном уровне, природа определяет основные характеристики веществ, явлений и процессов. Особенности свойств веществ и материалов в нанометровом диапазоне определяются не только уменьшением размеров структурных элементов, но и проявлением квантовомеханических эффектов, волновой природой процессов переноса и доминирующей ролью поверхностей раздела. Управляя размерами и формой наноструктур, можно придавать материалам совершенно новые функциональные характеристики, значительно отличающиеся от характеристик массивных материалов. Кроме того, в ряде специальных случаев НСП должны обладать особыми физико-химическими или химическими свойствами, например, биodeградируемостью,

либо особой прочностью, либо гибкостью, либо иметь пористую структуру для формирования межклеточного вещества (матрикса). На основе НСП, модифицированных соответствующим образом, также могут быть реализованы биокатализаторы для различных процессов биотехнологий.

Полученные экспериментальные результаты открывают новые технологические подходы к созданию биологически активных систем.

В результате морфологических исследований донорского материала роговицы было констатировано, что после хранения донорской роговицы в течение 1-2 суток, не выявлялись какие-либо существенные морфологические изменения со стороны ЭК донорской роговицы, независимо от способа ее хранения: типа консервирующей среды, длительности и температуры хранения донорской роговицы,. Патологические морфологические изменения выявлялись на 4 день хранения донорской роговицы во влажной камере, на 5-6 день хранения в среде Eagle's. В специальных контейнерах, в консервирующих средах Optisol, Dexo1 донорские роговицы хранились при температуре 25-27С, сохраняя должное качество донорской роговицы до 17 дней. Обнадеживающие результаты были получены при хранении донорской роговицы в специальном контейнере в плазме крови донора. Донорская роговица оставалась структурной: сохранение апикальной и, что еще более важно – латеральных границ ЭК, на протяжении более 20 дней. Как известно, состояние латеральных границ клеточных мембран ЭК весьма важно для осуществления механизма транспорта жидкости через ЭК (J.Fischbarg, 1997). При условии хранения донорской роговицы в плазме мы не наблюдали появления осадка в консервирующей среде, что имело место при хранении в средах Optisol, Dexo1, после 15 дней хранения донорской роговицы, в 10% случаев. Плотность и количество ЭК определялись и сравнивались до начала консервации и через 5, 10, 15, 20 дней хранения 20 донорских роговиц, разделенных на 5 групп по способу хранения. Данные исследования приведены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты определения количества ЭК донорских роговиц консервированных разными способами хранения.

Среда	До консервации	Через 5 дней	Через 10 дней	Через 15 дней	Через 20 дней
Влажная камера	2260	1490			
Eagle's	2190	1740	1320		
Optisol	2360	2200	1930	1880	1740
Dexol	2280	2150	1950	1860	1770
Плазма донорской крови	2330	2240	2200	1970	1930

Наибольшая потеря числа ЭК донорской роговицей происходит в течение первых 5-10 дней консервации донорского материала. Донорские роговицы хранившиеся во влажной камере и среде Eagle's через, соответственно, 5 и 10 дней обнаружили структурные (морфологические) изменения, не позволявшие их дальнейшее исследование. Донорские роговицы хранившиеся в специальных контейнерах с консервирующими средами сохраняли структурность и плотность ЭК, т.е. оставались жизнеспособными на более длительный срок консервации. Электростатические свойства НСП могут способствовать либо адгезии на поверхности химических соединений, белковых структур, клеток, клеточных структур, либо НСП может проявлять себя как интактная в отношении определенных соединений. Поэтому потерю ЭК донорской роговицей можно предупредить помещением донорской роговицы в специальный контейнер, который, кроме бандажной, выполняет функцию биологически активной системы, так как НСП специального контейнера способствует восстановлению потенциала клеточных мембран структур роговицы.

Как известно, поляризация клеточных мембран обеспечивается постоянной векторной трансфузией гуморальных жидкостей, при этом направление вектора движения определяется градиентом концентрации.

В 1974 г. Темировым Н.Э. был предложен раздельносредный метод консервации, в основу которого положен принцип искусственного моделирования условий существования роговой оболочки как части жизнеспособного

глазного яблока. Впервые была предложена динамическая модель воссоздания условий для изолированной роговицы, имитирующих физиологические. Взаимодействие консервирующих жидкостей с донорской роговицей в специально сконструированном для этой цели устройстве, состоящем из 2-х изолированных камер, фиксирующего приспособления и системы для оксигенации, очевидно было первой (эмпирической) попыткой к искусственному воссозданию векторной трансфузии жидкости через структуры донорской роговицы для поддержания, таким образом, ее жизнеспособности.

Разработанная нами система: донорская ткань - наномодифицированная, биосовместимая, асептическая поверхность - питательная среда, по результатам проведенных исследований, является более совершенной динамической моделью для хранения жизнеспособного донорского материала.

Заключение

Применение полимерных пленок, покрытых углеродсодержащими покрытиями с НСП, имеющих заданные физико-химические свойства, позволяет пролонгировать жизнеспособность консервируемых донорских материалов при сохранении их биопластических свойств.

Обоснованы оптимальные параметры асептических биосовместимых углеродсодержащих покрытий при создании специальных контейнеров и упаковочных пленок для хранения донорских материалов:

Разработанные покрытия с НСП могут быть использованы для обработки поверхности специальных контейнеров и упаковочных пленок для консервации донорских материалов.

НСП углеродсодержащих покрытий обладают антибактериальными свойствами. НСП специального контейнера, создавая в физиологическом буферном растворе слабую катионическую среду, исключает существование ка-

ких-либо контаминаций в ней; способствует поляризации клеточных структур, восстанавливая потенциалы клеточных мембран, тем самым сохраняет форму и структуру донорской ткани.

Адгезивные свойства этих покрытий определяются электростатическими свойствами НСП и могут способствовать либо адгезии на поверхности химических соединений, белковых структур, клеток, клеточных структур, либо НСП может проявлять себя как интактная в отношении определенных соединений.

Применение асептических специальных контейнеров и упаковочных пленок с биосовместимой поверхностью позволяет увеличивать сроки консервации донорских материалов и иметь запасы донорского материала. Использование для трансплантации сохранившего жизнеспособность качественного донорского материала обеспечивает благополучный исход операции, уменьшает риск послеоперационных осложнений.

Создание биологически активной системы с помощью формирования наноструктурированной поверхности - это решение проблемы длительного хранения жизнеспособных донорских тканей.

Внедрение результатов работы

Разработанный упаковочный материал для хранения аллотрансплантатов и специальный контейнер для хранения донорской роговицы с биосовместимой асептической наноструктурированной поверхностью могут использоваться в работе тканевых банков. Углеродсодержащее покрытие, модифицирующее поверхность обрабатываемого полимера обеспечивает асептические условия хранения аллотрансплантатов, в том числе донорской роговицы и способствует поддержанию метаболических процессов в донорских тканях. Возможность длительного хранения жизнеспособных донорских тканей и, в том числе, донорской роговицы в асептических пленках и контейнерах с биосовместимой поверхностью, а также безопасная транспортировка донорского материала, позволят иметь запасы донорского материала.

Использование для трансплантации сохранившего жизнеспособность качественного донорского материала обеспечивает благополучный исход операции, уменьшает риск послеоперационных осложнений, гарантирует успешное приживление трансплантата.

Список использованных сокращений

ПЭТФ - полиэтилентерефталат

ПТФЭ - политетрафторэтилен

ПВДФ – поливинилиденфлюорид

НПС- наноструктурированная поверхность

УП-углеродсодержащая пленка

ИК-спектроскопия – спектроскопия в инфракрасном спектре

ЭСХА- электронная спектроскопия для химического анализа

АСМ - атомно-силовой микроскоп

ВЧ- высокочастотное

Staphylococcus aureus ATCC 29213- музейный штамм грамположительного микроорганизма

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853- музейный штамм грамотрицательного микроорганизма

УП – углеродное покрытие

нм- нанометр

r- горизонтальный размер

L -периметр

V -объем особенностей рельефа поверхности, шероховатость поверхности

Rq -среднеквадратичное отклонение

S- площадь

DF - фрактальная размерность.

θ -контактный угол смачивания

γ - величина полной поверхностной энергии

γ_P - полярная компонента γ

γ_d дисперсионная компонента γ

ЭК- эндотелиальная клетка

Литература

1. V.V. Sleptsov, V.M. Elinson, N.V. Simakina, A.N. Laymin, I.V. Tsygankov, A.A. Kivaev, A.D. Moussina. Ophthalmologic application of contact lenses modified by means of ionassisted carbon films. *Diamond and Related Materials*; 5 (1996); 483-485; USA.
2. Moussina Alvina D. The improvement in contact lens quality with contact lens cases surface modified by diamond-like and carbyne films covering Advance. *Science. Technology. Italy*; 1999, XXI; 425-432.
3. V.M. Elinson, V.V. Sleptsov, A.N. Laymin, V.V. Potrasay, L.N. Kostuychenko, A.D. Moussina. Barrier properties of carbon films deposited on polymer-based devices in aggressive environments. *Diamond and Related Materials*; 8; (1999); 2103-2109; USA.
4. В.М. Елинсон, В.В. Слепцов, А.Н. Лямин, В.В. Потрясай, А.Д. Мусина. Модификация поверхности офтальмологических жестких контактных линз с помощью углеродсодержащих пленок, нанесенных ионно-плазменными методами. *Инженерный журнал*; №11 (32); 59-60;1999.
5. В.М. Елинсон, В.В. Слепцов, А.Н. Лямин, В.В. Потрясай, Л.Н. Костюченко, А.Д. Мусина. Барьерные свойства углеродных пленок, нанесенных на полимерную основу, в условиях агрессивной окружающей среды. *Инженерный журнал*; №11 (32); 61-64;1999.
6. А.Д. Мусина, В.М. Елинсон, В.В. Потрясай, А.Н. Лямин, Р.И. Кузнецов. Формирование контейнеров для контактных линз с бактериостатической поверхностью. *Материалы международной научно-технической конференции “Вакуумная наука и техника”*; 275-281; 2002; МИЭМ.
7. A.D. Moussina. Artificial Iris Surface Modification By Means Of Carbon Film Deposition For Providing The Eye Diaphragm Loss Compensation. *The First UAE International Conference on Biological and Medical Physics; Conference Proceedings*; 2005; Al Ain, UAE.
8. Moussina Alvina D., Egorov Eugene A., Galimova Venera U., Nigmatullin Rafic T. New Method of Donor Cornea Storage and Transportation Providing Donor Tissue Quality and Biocompatibility. *WOC, Brasil, ; Conference Proceedings*, 2006.
9. Moussina Alvina D. L’application Des Nanotechnologies Pour Une Conservacion De La Cornee Du Donneur. *Le 112 Congres De La SFO, Paris; Conference Proceedings* 2006.
10. Moussina Alvina D. The Application of Nanostructured Surface for the Recovering of the Cornea. *1st International Conference for Ocular Cell Biology*, 6-10 September, Homerton College, Cambridge, UK, 2006.