

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 57.085.23+677.494+66.022.6

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМЕННОЙ ОБРАБОТКИ БИОМЕДИЦИНСКИХ МАТРИКСОВ НА АДГЕЗИЮ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. А. М. Азиева¹, Е. В. Ястремский^{1,2}, Д. А. Кириллова¹, Т. Д. Пацаев¹, А. А. Михуткин¹,
Р. В. Шариков¹, Р. А. Камышинский^{1,2}, К. И. Луканина¹, Н. А. Шарикова¹,
Т. Е. Григорьев¹, А. Л. Васильев^{1,2,3,*}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

³Московский физико-технический институт, Москва, Россия

*E-mail: a.vasiliev56@gmail.com

Поступила в редакцию 31.03.2023 г.

После доработки 31.03.2023 г.

Принята к публикации 21.04.2023 г.

Адгезивные свойства матриксов, преимущественно зависящие от химических и структурных особенностей их поверхности, играют важнейшую роль в тканевой инженерии. С помощью флуоресцентной и растровой электронной микроскопии в режиме окружающей среды исследована адгезия клеток диссоциированной нейрональной культуры на изотропных и анизотропных нетканых и губчатых матриксах из полилактида. Нейроны, полученные из головного мозга новорожденных мышей, демонстрировали улучшенную адгезию на матриксах всех типов после обработки плазмой, при этом наиболее выраженный эффект наблюдался на неориентированных матриксах.

DOI: 10.31857/S0023476123600210, EDN: JJWTPR

ВВЕДЕНИЕ

Первичные нейрональные культуры используются не только для фундаментальных исследований, но и для разработки методов лечения неврологических патологий и травм [1–3]. Рост и имплантация культуры нейронов требуют подходящих матриксов. Основными требованиями к таким матриксам являются биосовместимость, биodeградация, высокая клеточная адгезия, способствующая пролиферации, дифференцировке клеток и обеспечению нейрональной активности [4]. В большинстве случаев матриксы из синтетических полимеров демонстрируют определенные преимущества за счет легкости формообразования, высокой прочности и устойчивости к растяжению. Рекомендуется использовать для имплантатов многочисленные синтетические полимеры, в том числе полистирол, полилактид (ПЛА), полигликолевую кислоту и полилактид-гликолевую кислоту [5–7]. Эксперименты по регенерации тканей [8] продемонстрировали хорошую биосовместимость матриксов из ПЛА, несмотря на гидрофобную природу соединения. ПЛА разлагается в тканях организма до молочной кислоты путем гидролиза и метаболизируется до углекислого газа и воды.

Проблему плохой смачиваемости поверхности матрикса из ПЛА, препятствующую адгезии кле-

ток, можно решить несколькими способами. Поверхность может быть предварительно обработана поли-Д-лизиновыми или полиэтиленовыми пептидами, которые придают ей положительный заряд и способствуют адгезии клеток [9]. Другим способом является плазменная обработка, увеличивающая шероховатость и гидрофильность поверхности матрикса на основе ПЛА [10], оставляя практически неизменными другие характеристики материала. Изучение эффекта плазменной обработки поверхностей матриксов (в том числе, матриксов из ПЛА) и ее положительного влияния на адгезию и пролиферацию клеток рассмотрено в ряде обзоров и научных работ [11–15]. В частности, существенное влияние обработки плазмой поверхности матрикса на адгезию, пролиферацию и дифференцировку нейрональных стволовых клеток отмечено в [13–15]. Однако эксперименты со стволовыми клетками продемонстрировали и ряд отрицательных результатов, таких как низкий уровень жизнеспособности клеток и плохой контроль их дифференцировки. В настоящем исследовании использовались первичные нейрональные клетки, прошедшие дифференцировку, и эксперимент был направлен исключительно на изучение клеточной адгезии и пролиферации.

Таблица 1. Список и обозначения образцов матриксов из ПЛА

Тип матрикса	Без обработки плазмой	Обработанные плазмой
Неориентированная губка	ГН	ГН*
Ориентированная губка	ГО	ГО*
Неориентированный нетканый волокнистый материал	НН	НН*
Ориентированный нетканый волокнистый материал	НО	НО*

Таким образом, в настоящей работе представлены результаты исследования адгезии культуры клеток первичных нейронов мыши на различных матриксах из ПЛА, а именно, ориентированных и неориентированных нетканых и губчатых матриксах до и после обработки плазмой в разреженной атмосфере воздуха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление и обработка матриксов. Для получения образцов матриксов различных типов использовали ПЛА марки 4032D (NatureWorks, США). В качестве растворителей использовали диоксан (ЧДА, “Компонент-Реактив”), хлороформ и этиловый спирт (ХЧ, “Компонент-Реактив”).

Для получения пористых материалов на основе ПЛА полимер растворяли в 1,4-диоксане при постоянном перемешивании в магнитной мешалке в течение 24 ч. Концентрация раствора составила 3 мас. %. Затем раствор замораживали при температуре, -22°C в холодильнике и перемешивали дважды в процессе заморозки для равномерного распределения кристаллов растворителя. После этого образцы лиофилизировали в течение 48 ч на установке Alpha 2-4LSC (Martin Christ, Германия). Диаметр образца составлял 25 ± 1 мм при высоте 3 ± 1 мм.

Нетканые материалы получали методом электроформования из 9 мас. % раствора ПЛА в смеси растворителей: хлороформа и этилового спирта (90 : 10). Электроформование проводили на установке, разработанной в НИЦ “Курчатовский институт”, при комнатной температуре и следующих технологических параметрах: прикладываемое напряжение 12 ± 1 кВ, расстояние между капилляром и осадительным электродом 25 ± 1 см, объемный расход полимерного раствора 5 мл/ч. Характерный геометрический размер нетканого волокнистого материала составлял 50×50 мм при толщине 550 ± 50 мкм.

Все образцы подвергали плазменной обработке в атмосфере воздуха (при давлении воздуха 1.1–0.2 мбар) с одной из сторон в установке PELCO easiGlow (Ted Pella, США) при силе тока 20 мА в течение 60 мин.

В табл. 1 представлены описание и аббревиатуры всех используемых образцов матриксов из ПЛА с различной архитектурой и обозначено наличие/отсутствие плазменной обработки.

Культивирование клеточной культуры. Чтобы получить по 10 образцов адгезированных нейронов на каждом типе матриксов, использовали диссоциированные культуры клеток головного мозга новорожденных мышей. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в Приказе Минздрава России № 267 от 19.06.03 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

Диссоциирование клеток достигалось путем обработки фрагментов ткани мозга 0.25% трипсином (Invitrogen 25200-056, США). Осаждение полученных клеток из суспензии осуществлялось при помощи центрифуги при 1800 об./мин. в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в нейробазальной среде Neurobasal A без фенолового красного (Gibco™ 12349015, США) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (Invitrogen 17504-044), глутамином (Invitrogen 25030-024, США) и смесью антибиотиков (Gibco™ 15070063, США). Плотность клеточной культуры составляла не менее 1200 клеток/мм². Культивирование клеток проводили на поверхности матриксов, помещенных в чашки Петри с двумя миллилитрами культуральной среды. Матриксы предварительно замачивали в 96%-ном этаноле в течение 1 мин и промывали водой, затем обрабатывали 0.05%-ным полиэтиленгликолем в течение 20 мин. Адгезия нейронов на матриксах без покрытия (без обработки ПЛА) была существенно ниже. Поддержание жизнеспособности культуры осуществлялось в условиях CO₂-инкубатора при температуре 37°C и газовой смеси (95% воздуха и 5% CO₂). Смену культуральной среды осуществляли через сутки после посадки на матриксах и далее 1 раз в 3 дня. Время культивирования *in vitro* составляло 5–7 сут. Интервал времени выбирали из расчета, что именно на этом этапе у нейронов начинают формироваться дендриты [16] и появляется электрическая активность [17].

Для максимального ингибирования экспрессии генов и других процессов жизнедеятельности клеточных культур их перемещали на лед, сразу отмывали от культуральной среды и фиксировали с помощью 4%-ного параформальдегида (Sigma P6148, Германия) в течение 7–10 мин. После фиксации клетки отмывали 3 раза в течение 5 мин в однократном растворе PBS (Invitrogen 70011036, США).

Флуоресцентная микроскопия. Для флуоресцентной микроскопии после фиксации ядра клеток окрашивали с помощью ДНК-специфического маркера Hoechst 33342 Solution (Thermo Scientific™ 62249, США) в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте, после чего клет-

ки отмывали раствором PBS в течение 3–5 мин. Затем матриксы с клетками переносили на предметные стекла, покрывали водной заливочной средой Fluoromount (Sigma F4680, Германия) и накрывали покровными стеклами.

Для исследований образцов методом флуоресцентной микроскопии использовали универсальный биологический микроскоп Carl Zeiss Axio Imager.Z1 (Zeiss, Германия). Микрофотографии всех исследуемых образцов получали в одних и тех же условиях интенсивности возбуждающего света и экспозиции при использовании объектива 60 (увеличение $\times 600$) с одновременным получением изображений по методу фазового контраста.

Подсчет ядер нейрональной культуры проводили при помощи программного обеспечения Fiji [18]. В табл. 2 представлены количества исследованных полей зрения для каждого из образцов.

Растровая электронная микроскопия в режиме естественной среды (ЕРЭМ). Исследования методами ЕРЭМ проводили на микроскопе Versa 3D DualBeam SEM (ThermoFisher Scientific, США). Образцы помещали на столик с пельтье-охлаждением при 10°C и 100%-ной влажности, давление в камере опускалось до низкого вакуума (1220 Па). Сначала все образцы исследовали при 100%-ной влажности, но при таких условиях поверхность частично или полностью была покрыта слоем воды из образца, поэтому в течение эксперимента давление в камере опускалось до 980 Па, что позволяло полностью изучить их морфологию, а также значительно улучшало отношение сигнала к шуму при получении изображений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Флуоресцентная микроскопия. На рис. 1 представлено сравнение флуоресцентных фотографий ядер нейронов на всех четырех типах матриксов без обработки (левая колонка) и после обработки плазмой (правая колонка).

Флуоресцентная микроскопия выявила, что адгезия нейрональной культуры на каждом из четырех типов матриксов была разной. На губчатом матриксе ГН нейроны располагались неравномерно, в основном на поверхности и в виде небольших монослойных скоплений (рис. 1а). Небольшое количество клеток на поверхности матрикса может быть связано с их проникновением в поры матрикса. На более плотных губчатых матриксах ГО (рис. 1в) адгезия была значительно более равномерной и без выраженных скоплений клеток.

На нетканом матриксе НН клетки распределялись равномерным монослоем по всей поверхности без кластеризации (рис. 1д). Расстояние между клетками варьировалось в диапазоне от 5 до 50 мкм. Однако на ориентированном нетканом матриксе НО адгезия нейронов была неравно-

Таблица 2. Среднее количество клеток по полям зрения

Образец	Количество клеток	Образец	Количество клеток	Прирост клеток, %
ГН	22.2	ГН*	73.30	230
ГО	92.5	ГО*	95.50	3
НО	71.2	НО*	89.1	25
НН	64.2	НН*	105.6	64

мерной, в виде скоплений близкорасположенных друг к другу клеток (рис. 1ж).

Обработка плазмой в течение 60 мин привела к улучшению адгезии клеток нейрональной культуры на всех типах матриксов. По результатам микроскопических исследований незначительное увеличение среднего количества клеток после плазменной обработки наблюдалось на ориентированных матриксах ГО* и НО* (рис. 1г, 1з соответственно), тогда как на неориентированных матриксах ГН* и НН* увеличение адгезии клеток было существенным (рис. 1б, 1е соответственно).

Для количественной оценки адгезии клеток нейрональной культуры подсчитывали среднее количество клеток в 10 полях зрения на каждом типе матриксов. Программное обеспечение ImageJ (NIST, США) [19] использовали для цифрового анализа изображений на первом этапе. Затем был проведен статистический анализ с помощью GraphPad Prism 9.4.1 (681) (La Jolla, Калифорния, США). Нормальность распределения оценивали с помощью теста Колмогорова–Смирнова. На последнем этапе анализа применяли непараметрический критерий ANOVA Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением и апостериорным критерием Данна со значением $P < 0.05$.

Результаты подсчета клеточных ядер на всех матриксах представлены на рис. 2. Статистически значимые различия наблюдались между группами ГН и ГН*. Между другими группами статистически значимых различий выявлено не было.

Для количественной оценки увеличения адгезии нейрональной культуры были подсчитаны среднее количество клеток по всем полям зрения для каждого матрикса (табл. 2) и процент увеличения количества клеток.

Согласно полученным результатам плазменная обработка наилучшим образом повлияла на адгезию на неориентированных матриксах: для матрикса ГН среднее количество клеток увеличилось на 230%, для матрикса НН — на 64%. Тогда как для ориентированных матриксов увеличение адгезии составило 3% для ГО и 25% для НО.

Растровая электронная микроскопия в режиме естественной среды. Параллельно с флуоресцентной микроскопией адгезированные на матриксах нейроны исследовали с помощью метода ЕРЭМ. Поскольку ЕРЭМ позволяет визуализировать

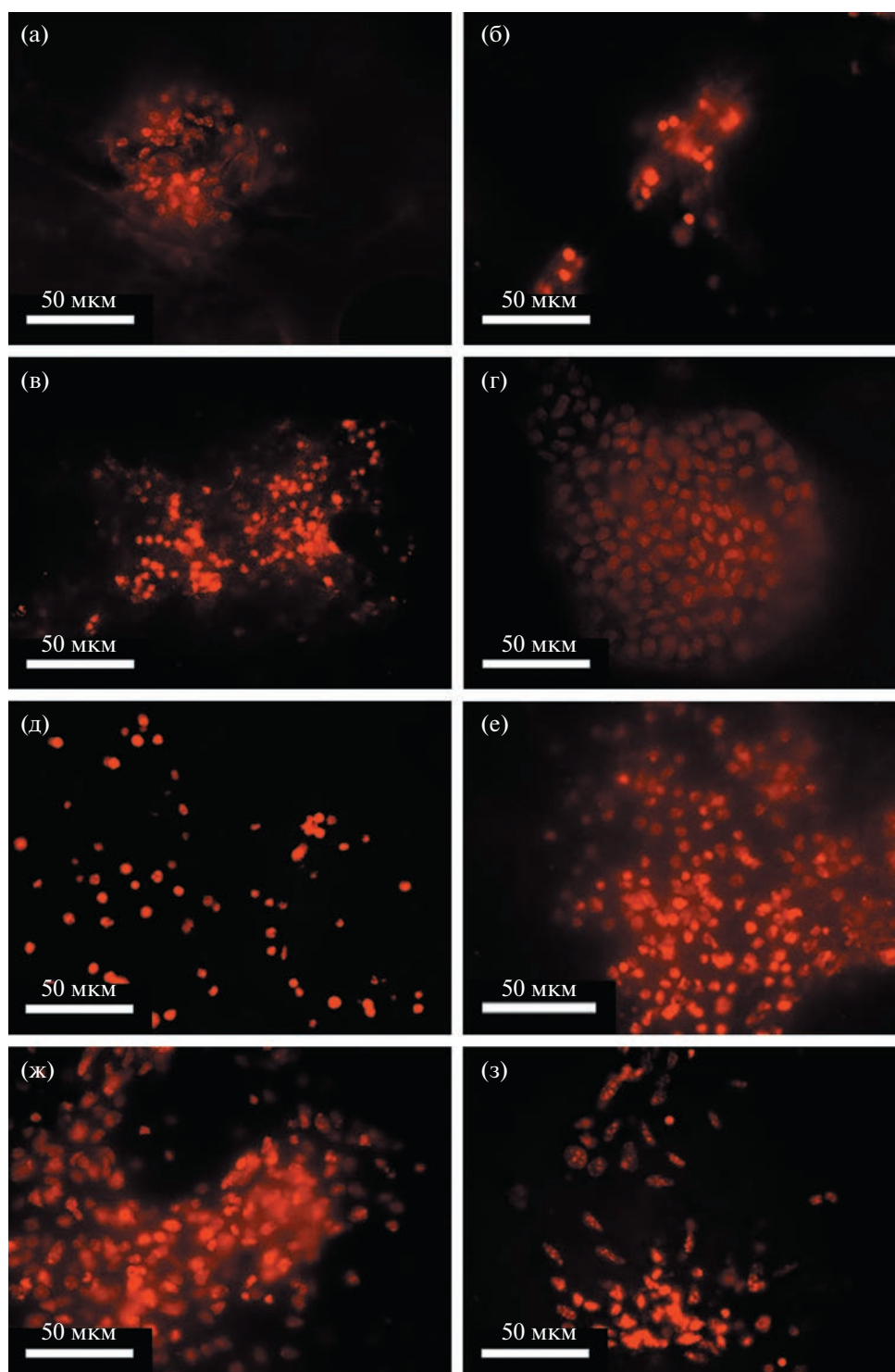


Рис. 1. Сравнение флуоресцентных фотографий ядер нейрональной культуры на матриксах, не обработанных (левая колонка) и обработанных плазмой в течение 60 мин (правая колонка): а – ГН, б – ГН*, в – ГО, г – ГО*, д – НН, е – НН*, ж – НО, з – НО* (табл. 1).

клетки только на поверхности матриксов, этот метод использовали только для качественной оценки клеточной адгезии.

Обнаружили заметную разницу в распределении клеток на поверхности всех типов образцов до и после плазменной обработки (рис. 3). Оба

губчатых матрикса – неориентированный (ГН, рис. 3а) и ориентированный (ГО, рис. 3в) – демонстрируют морфологию, близкую к исходным образцам (без клеток).

После процедуры плазменной обработки наблюдались уменьшение пористости и резкое из-

менение морфологии поверхности в обоих образцах: неориентированном ГН* (рис. 3б) и ориентированном ГО* (рис. 3г). Такие изменения указывают на превосходную адгезию клеток и их пролиферацию в образцах после обработки плазмой. Аналогичное поведение клеток наблюдалось на неориентированном нетканом матриксе НН до и после обработки плазмой (рис. 3д, 3е соответственно). На матриксе НН клетки в основном находятся на пересечениях волокон. После обработки плазмой целые волокна покрываются внеклеточным матриксом (ВКМ), и распределение клеток становится более однородным. Адгезия клеток в ориентированном нетканом матриксе НО совершенно иная (рис. 3ж). Волокна в этом матриксе плотно упакованы, а размеры пор относительно малы для проникновения клеток в толщу образца. В результате на поверхности образца НО образуется относительно толстый клеточный слой. Не было обнаружено заметной разницы в количестве клеток на нетканом ориентированном матриксе НО* после плазменной обработки (рис. 3з). И в этом случае проявлялся относительно толстый слой клеток на поверхности матрикса с небольшими порами размером ~10 мкм и трещинами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Материалы на основе синтетических полимеров, как правило, плохо смачиваются водой, склеиваются и имеют низкую адгезию различных веществ на поверхности. Плазмохимическая модификация материалов подвергает изменениям лишь обрабатываемую поверхность и приповерхностный слой, толщина которого может составлять от десятков нанометров до единиц микрометров. Обработка плазмой приводит в основном к изменению поверхностных контактных свойств материалов — увеличению смачиваемости и адгезии, при этом не происходит существенных изменений физико-механических характеристик [20]. При обработке материалов плазмой в атмосфере воздуха происходит образование кислородосодержащих полярных групп на поверхности материала (верхний слой — 10 нм и менее) без нарушения объемных свойств [21, 22].

Кроме того, происходит изменение атомного состава, связанное с потерей низкомолекулярных соединений за счет окисления и обрыва полимерных цепей на верхних слоях материала [23]. Указанные выше процессы могут приводить к изменению рельефа поверхности — шероховатости материала, что в свою очередь сводится к увеличению удельной поверхности, а также свободной поверхностной энергии за счет увеличения вклада полярных групп [24, 25]. Применение плазмохимической обработки также позволяет значительно улучшить адгезию клеточных культур на поверхности матрикса [26].

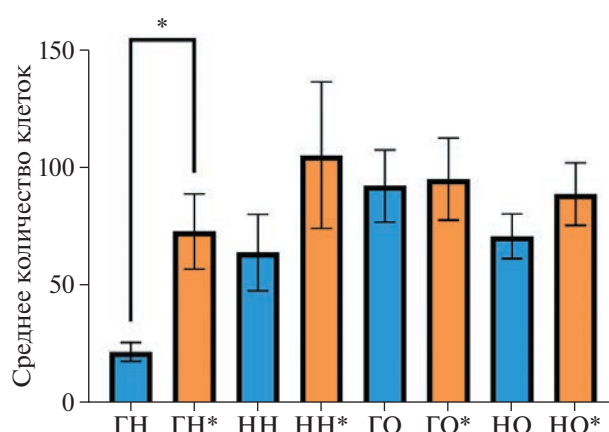


Рис. 2. Среднее количество клеток на матриксах до (темные столбцы) и после (светлые столбцы) обработки плазмой.

Исследования взаимодействия между остеобластоподобными клетками МС3Т3-Е1 и пленками ПЛА, обработанными воздушной плазмой, показали, что воздушная плазма может значительно усиливать как клеточную адгезию, так и клеточную пролиферацию [27–29].

Аналогичные результаты получены в настоящем исследовании: адгезия культуры первичных нейрональных клеток мыши на различных матриксах ПЛА после обработки плазмой в атмосфере воздуха увеличивается. Количественные результаты флуоресцентной микроскопии показали, что плазменная обработка является наиболее эффективной для адгезии клеток на неориентированных матриксах, а именно образцах ГН* и НН*. Среднее количество клеток увеличилось на 230% в случае неориентированного губчатого матрикса (ГН*) и на 64% в случае неориентированного нетканого матрикса (НН*). Это также подтверждается исследованиями ЕРЭМ.

Флуоресцентная микроскопия не показала заметных изменений числа клеток на обработанных плазмой ориентированных губчатых матриксах ГО* по сравнению с необработанными ориентированными матриксами ГО, увеличение составило всего 3%. Однако с помощью ЕРЭМ был получен другой результат: отчетливо видимый толстый монослой покрывал всю поверхность матрикса. Происхождение этого слоя может быть объяснено двумя способами:

- более узкие поры ориентированного губчатого матрикса препятствуют проникновению клеток вглубь и также препятствуют проникновению плазмы, в результате чего происходит интенсивный рост клеток только в областях, близких к поверхности;

- на поверхности губчатого матрикса присутствуют фрагменты ВКМ, а не клеточные ядра, которые наблюдались на флуоресцентных микрофотографиях.

Увеличение количества клеток на ориентированном нетканом матриксе после обработки

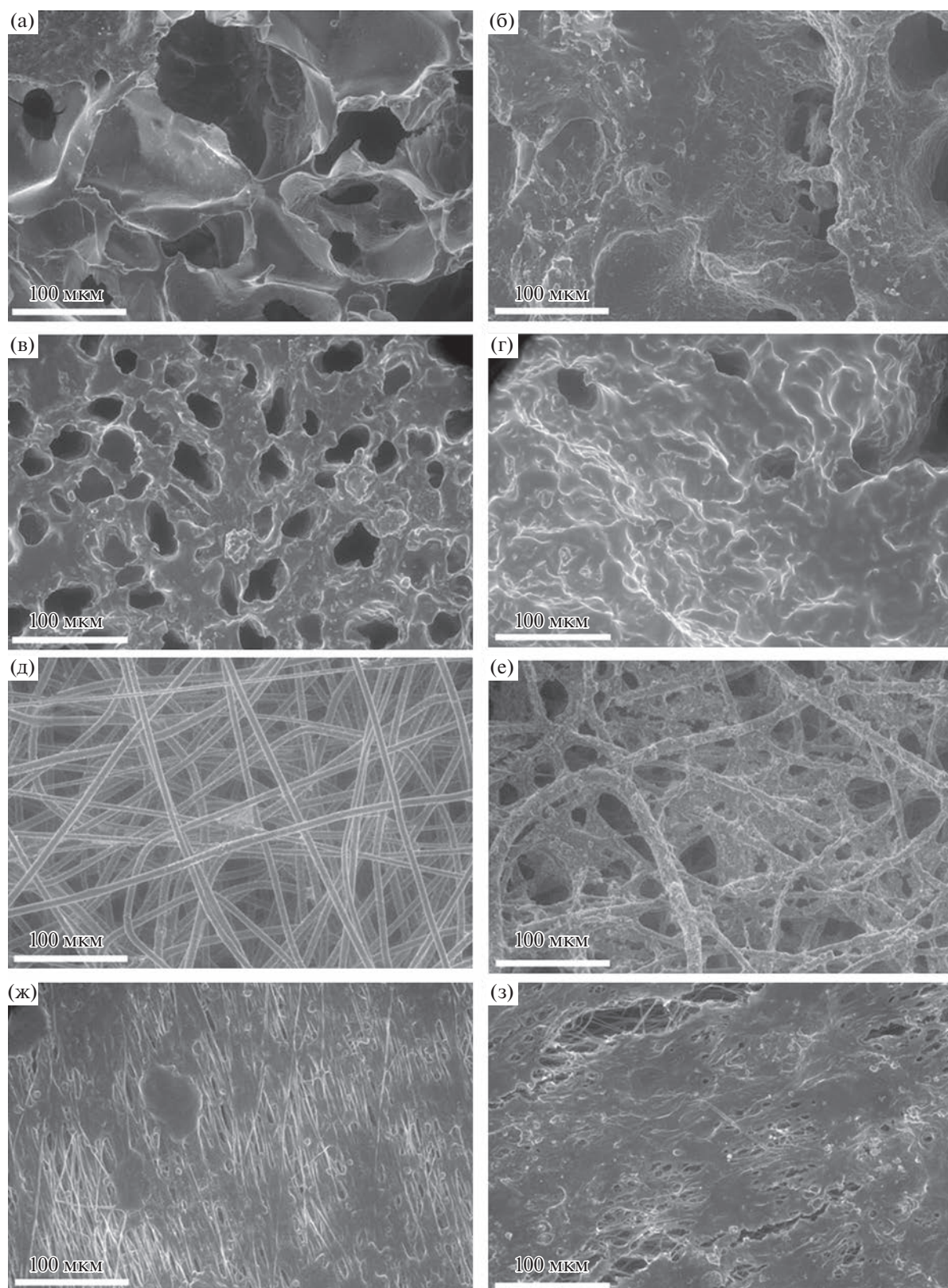


Рис. 3. Сравнение ЕРЭМ-изображений образцов матриц с нейрональной культурой, не обработанных (левая колонка) и обработанных плазмой в течение 60 мин (правая колонка): а – ГН, б – ГН*, в – ГО, г – ГО*, д – НН, е – НН*, ж – НО, з – НО* (табл. 1).

плазмой (НО*) составило 25% по сравнению с не-обработанным образцом (НО), что значительно больше, чем в случае образцов пары ГО—ГО*, что скорее всего связано с ограничением, накладываемым относительно малым размером пор.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью флуоресцентной микроскопии и ЕРЭМ была изучена адгезия клеток первичной нейрональной культуры на различных типах матриксов на основе ПЛА: ориентированных и неориентированных нетканых и губчатых матриксах до и после обработки плазмой в воздушной среде. Установлено, что во всех типах матриксов плазменная обработка увеличивает адгезию клеток к матриксу. Наиболее выраженный эффект (увеличение адгезии клеток более чем в 2 раза) обнаружен на неориентированных губчатых матриксах. Относительно большое увеличение адгезии также наблюдалось на неориентированных нетканых матриксах. На ориентированных губчатых и нетканых матриксах также наблюдалось увеличение адгезии клеток после обработки плазмой, но оно было менее выраженным. Исследование ЕРЭМ продемонстрировало равномерное покрытие поверхности ориентированных губчатых и нетканых матриксов, что, предположительно, связано с наличием ВКМ.

Таким образом, изменение топографии поверхности и гидрофильности полимерных матриксов позволяет повысить клеточную адгезию культур нейронов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-13-00321 “Деформационное поведение биоразлагаемых матриксов различного типа при механических нагрузках”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Suñol C., Babot Z., Fonfría E. et al. // Toxicol. In. Vitro.* 2008. V. 22. P. 1350.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.03.009>
2. *Ji C., Tang M., Johnson G.V. // Methods Cell Biol.* 2017. V. 141. P. 229.
<https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.06.011>
3. *Wellbourne-Wood J., Chatton J.Y. // ACS Chem. Neurosci.* 2018. V. 9. P. 1975.
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00098>
4. *Zhang Y., Venkateswaran S., Higuera G.A. et al. // Adv. Healthc. Mater.* 2020. V. 9. № 4. P. 1901347.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201901347>
5. *Huang W., Sunami Y., Kimura H., Zhang S. // Nanomaterials.* 2018. V. 8. P. 519.
6. *Giordano G.G., Thomson R.C., Ishaug S.L. et al. // J. Biomed. Mater. Res.* 1997. V. 34. P. 87.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199701\)34:1<87::AID-JBM12>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199701)34:1<87::AID-JBM12>3.0.CO;2-M)
7. *Huang H.D., Xu J.Z., Fan Y. et al. // J. Phys. Chem. B.* 2013. V. 117. P. 10641.
<https://doi.org/10.1021/jp4055796>
8. *Annunziata M., Nastri L., Cecoro G., Guida L. // Molecules.* 2017. V. 22. P. 2214.
9. *Okamura Y., Kabata K., Kinoshita M. et al. // Adv. Mater.* 2009. V. 21. P. 4388.
<https://doi.org/10.1002/adma.200901035>
10. *Ястремский Е.В., Пацаев Т.Д., Михуткин А.А. и др. // Кристаллография.* 2022. V. 67. № 3. С. 421.
<https://doi.org/10.31857/S0023476122030249>
11. *Morent R., De Geyter N., Desmet T. et al. // Plasma Processes Polym.* 2011. V. 8. № P. 171.
<https://doi.org/10.1002/ppap.201000153>
12. *Asadian M., Chan K.V., Norouzi M. et al. // Nanomaterials.* 2020. V. 10. P. 119.
13. *Travnickova M., Kasalkova N.S., Sedlar A. et al. // Biomed. Mater.* 2021. V. 16. № 2. P. 25016.
<https://doi.org/10.1088/1748-605X/abaf97>
14. *Yu X., Mengsteab P.Y., Narayanan G. et al. // Engineering.* 2021. V. 7. № 2. P. 153.
<https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.02.010>
15. *Santoro M., Shah S.R., Walker J.L., Mikos A.G. // Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. V. 107. P. 206.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.019>
16. *Kudryavtseva V., Stankevich K., Gudima A. et al. // Mater. Des.* 2017. V. 127. P. 261.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.04.079>
17. *Kleiman R., Banker G., Steward O. // J. Neurosci.* 1994. V. 14. № 3. P. 1130.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-03-01130.1994>
18. *Sokolov I., Azieva A., Burtsev M. // Biologically Inspired Cognitive Architectures (BICA) for Young Scientists.* Springer, 2016. P. 241.
19. *Kopaeva M.Y., Azieva A.M., Cherepov A.B. et al. // Pathogenesis.* 2021. V. 19. № 1. P. 74.
20. *Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E. et al. // Nature Methods.* 2012. V. 9. № 7. P. 676.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
21. *Kudryavtseva V., Stankevich K., Gudima A. et al. // Mater. Des.* 2017. V. 127. P. 261.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.04.079>
22. *Poll H.U., Schladitz U., Schreiter S. // Surf. Coat. Technol.* 2001. V. 142–144. P. 489.
[https://doi.org/10.1016/S0257-8972\(01\)01055-6](https://doi.org/10.1016/S0257-8972(01)01055-6)
23. *Ivanov V.B., Behnisch J., Hollander A. et al. // Surf. Interface Anal.* 1996. V. 24. P. 257.
24. *Jordá-Vilaplana A., Fombuena V., García-García D. et al. // Eur. Polym. J.* 2014. V. 58. P. 23.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.06.002>
25. *Bolbasov E.N., Maryin P.V., Stankevich K.S. et al. // Colloids Surf. B.* 2018. V. 162. P. 43.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.028>
26. *Yang L., Chen J., Guo Y., Zhang Z. // Appl. Surf. Sci.* 2009. V. 255. № 8. P. 4446.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.11.048>
27. *Wang M., Favi P., Cheng X. et al. // Acta Biomater.* 2016. V. 46. P. 256.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.030>
28. *Nakagawa M., Teraoka F., Fujimoto S. et al. // J. Biomed. Mater. Res. A.* 2006. V. 77. P. 112.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30521>
29. *Teraoka F., Nakagawa M., Hara M. // Dent. Mater. J.* 2006. V. 25. P. 560.
<https://doi.org/10.4012/dmj.25.560>