

2. Кирюхин Д.П., Ким И.П., Бузник В.М. Радиационно-химические методы получения защитных, гидрофобных и антифрикционных покрытий с использованием тетрафторэтилена. 7-я всерос. конф. «Химия фтора». Москва, 2006.
3. Кирюхин Д.П., Ким И.П., Бузник В.М. Химическая технология: Сб. тез. докл. междунар. конф. по химической технологии ХТ 07. М.: ЛЕНАНД, 2007, т. 3, с. 181—182.
4. Бузник В.М., Игнатьева Л.Н., Ким И.П., Кирюхин Д.П., Сахаров С.Г. Ж. физ. химии, 2008 (в печати).
5. Дехант И., Данц Р., Киммер В. Инфракрасная спектроскопия полимеров. М.: Химия, 1976, 472 с.
6. Игнатьева Л.Н., Цветников А.К., Бузник В.М., Михалин И.Н., Паукитис Е.А. Матер. II Евразийского форума по проблемам прочности материалов. Якутск, 2004, ч. IV, с. 55—64.
7. Игнатьева Л.Н., Белолитцев А.Ю., Козлова С.Б., Бузник В.М. Ж. структ. химии, 2004, № 4, с. 631—642.
8. Бузник В.М., Игнатьева Л.Н., Кайдалова Т.А., Ким И.П., Кирюхин Д.П. и др. Высокомолек. соед., 2008 (в печати).
9. Bouznik V.M., Kirik S.D., Solovyov L.A., Tsvetnikov A.K. Powder diffraction, 2004, т. 19, № 2, р. 1.
10. Антипов Е.М., Лебедев Ю.А., Королев Ю.М., Поликарпов В.М., Игнатьева Л.Н., Бузник В.М. Высокомолек. соед., 2007, т. 49, №6, с. 663—668.
11. Pompe G., Lappan U., Hausler L. Thermochem. Acta, 2002, v. 391, p. 257—269.
12. Бузник В.М., Губин С.П., Ким И.П., Кирюхин Д.П., Никитин Л.Н., Хохлов А.Р., Цветников А.К. Химическая технология: Сб. тез. докл. междунар. конф. по химической технологии ХТ 07. М.: ЛЕНАНД, 2007, т. 1, с. 29—33.
13. Антипов Е.М., Бузник В.М., Губин С.П., Игнатьева Л.Н., Кирюхин Д.П., Харитонов А.П., Хохлов А.Р. XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Тез. докл., 2008, т. 2, с. 17.

Плазмохимическое модифицирование фторуглеродных полимеров для создания новых гемосовместимых материалов

В. И. Севастьянов, В. Н. Василец

ВИКТОР ИВАНОВИЧ СЕВАСТЬЯНОВ — доктор биологических наук, профессор, руководитель Центра по исследованию биоматериалов при ФГУ «НИИ трансплантологии и искусственных органов» Росмедтехнологий. Область научных интересов: биоматериалы, биоинженерия, искусственные и гибридные органы. E-mail viksev@yandex.ru

ВИКТОР НИКОЛАЕВИЧ ВАСИЛЕЦ — доктор химических наук, ведущий научный сотрудник филиала Института энергетических проблем химической физики РАН. Область научных интересов: плазмохимия и фотохимия полимеров, биоматериалы, плазменная медицина, жидкокристаллические полимеры. E-mail vnvasilets@yandex.ru

123182 Москва, ул. Щукинская, 1, Центр по исследованию биоматериалов, ФГУ «НИИ трансплантологии и искусственных органов», Федеральное агентство здравоохранения и социального развития.

142432 Черноголовка, Московская область, просп. Акад. Семёнова, 1/10, филиал Института энергетических проблем химической физики РАН.

Введение

Фторуглеродные полимерные материалы находят все более широкое применение в различных областях современной медицины, в частности, в сердечно-сосудистой хирургии, офтальмологии, эндоскопии и ортопедии [1, 2]. Очевидным требованием ко всем биоматериалам, включая фторполимеры, является сочетание их физико-химических и физико-механических характеристик с биосовместимостью. В зависимости от конкретного применения фторполимера требования к биосовместимости могут быть самые различные, иногда противоречащие друг другу. Так, для надежного функционирования искусственных сосудов, дренажей, биосенсоров, эндоскопов или катетеров необходимо мини-

мизировать взаимодействие полимера с биологической средой. Напротив, в случае ортопедического применения требуется активное взаимодействие и срастание имплантата с тканью. Общими требованиями ко всем полимерным материалам медицинского назначения являются отсутствие токсичности, стабильность их в работе, а также простота изготовления и приемлемая стоимость изделий из биополимеров.

Реакция организма на полимерный имплантат определяется в основном его химическим составом, структурой и морфологическими особенностями полимерного материала. Для регулирования биологических свойств фторполимерных материалов необходимы методы, которые позволяли бы в широких пределах менять физи-

ко-химические, структурные и функциональные свойства поверхности, не затрагивая при этом объемных характеристик полимера, таких как прочность, эластичность, коэффициент пропускания, показатель преломления, электрофизические параметры и т.д. Таким универсальным и многофункциональным методом, широко используемым для модифицирования поверхностных характеристик полимеров, является обработка в низкотемпературной плазме газового разряда [3, 4]. В последнее время многообещающие результаты были получены при модифицировании медицинских полимеров вакуумным УФ-излучением [5, 6]. Можно выделить следующие актуальные направления использования плазмохимической обработки и вакуумного УФ-облучения фторуглеродных медицинских полимеров:

- модифицирование поверхностных физико-химических свойств (смачиваемости, поверхностной энергии, адсорбции белков, адгезии клеток, зарядовых состояний),

- направленное изменение морфологии поверхности (модифицирование рельефа, создание регулярных структур),

- функционализация и регулирование биологической активности поверхности полимера (иммобилизация белков и других биологически активных соединений, обладающих гемосовместимыми и биосенсорными свойствами).

Основное внимание в данной работе сфокусировано на использовании различных плазмохимических процессов модифицирования фторполимеров для получения новых гемосовместимых материалов.

Плазменная обработка и иммобилизация гемосовместимых материалов

Большое значение для биосовместимости полимера имеет смачиваемость или степень гидрофильности его поверхности, поскольку большинство биологических сред является водными растворами или содержат воду. Согласно «гипотезе комплементарности» [7], для повышения гемосовместимости необходимо обеспечить минимизацию не только среднего значения поверхностной энергии границы раздела материал/кровь, но и минимизацию энергии в каждой точке на поверхности, т.е. важное значение имеет характер распределения свободной энергии на границе раздела биоматериала со слоем адсорбированных белков. Путем обработки фторуглеродных полимеров в плазме кислород- или азотсодержащих газов (O_2 [3], CO_2 [8], H_2/H_2O [9], SO_2 [10], N_2 , NH_3 [10]) можно варьировать в широких пределах степень гидрофильности и поверхностную энергию фторполимеров за счет генерации различных полярных групп на их поверхности, регулируя тем самым процессы адсорбции белков и адгезии клеток.

Плазмохимическое травление, как правило, приводит к изменению морфологии поверхности полимера, которая имеет немаловажное значение для биосовмес-

тимости. Так, например, сглаживание поверхности при обработке биополимера в плазме кислород- и фторсодержащих газов положительно сказывается на его гемосовместимости — уменьшается вероятность тромбообразования на поверхностных неоднородностях в потоке крови [3].

Предварительная обработка плазмой газового разряда может быть использована для последующей прививки биологически активных соединений или иммобилизации биомолекул на поверхности медицинских полимеров. В качестве биологически активных соединений, повышающих гемосовместимость полимерных материалов, применяют главным образом нейтральные водорастворимые полимеры, такие как полиэтиленоксид, полиакриламид, полигидроксиэтилметакрилат, поли-N,N-диметилакриламид [11]. Среди всего разнообразия водорастворимых полимеров выделяют полиэтиленоксид и его эквивалент полиэтиленгликоль, обладающие уникальной комбинацией физико-химических и биологических свойств, а именно, хорошей растворимостью в водных и в большинстве органических сред, отсутствием токсичности и иммуногенности [12]. Известно, что в результате прививки молекул полиэтиленоксида уменьшается взаимодействие белков и клеток с поверхностью биополимера, что приводит к повышению гемосовместимости. Этот эффект объясняют высокой гидрофильностью и гибкостью цепей полиэтиленоксида и, как следствие, стерическим отталкиванием белковых молекул от поверхности [13].

Для иммобилизации полиэтиленоксидсодержащих соединений на поверхность фторуглеродных полимеров могут быть использованы различные методы: физическая адсорбция, химическая иммобилизация, прививочная полимеризация. В случае фторполимеров, отличающихся высокой химической инертностью и гидрофобностью, наилучший результат дает комбинация этих методов с плазмохимической обработкой и УФ-облучением [14].

Например, иммобилизацию полиэтиленоксида на поверхность политетрафторэтилена проводили следующим образом. Образец политетрафторэтилена подвергали предварительной обработке в микроволновой кислородной плазме [частота 2,45 ГГц, давление кислорода 10^{-3} Па, расход газа 20 см³/мин (н.у.)], после чего образец помещали в раствор моноакрилата полиэтиленоксида (мол. масса 1000 г/моль) в $CHCl_3$. Прививку полиэтиленоксида инициировали светом ртутной лампы высокого давления. По окончании процесса образец политетрафторэтилена промывали в деионизованной воде в течение 24 ч для удаления непривитого полимера и высушивали при 60 °С 1 ч.

Образцы анализировали методами ИК-фурье-спектроскопии, рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) и по измерению углов смачивания. Методом спектральной эллипсометрии измеряли скорость адсорбции фибриногена (компонент плазмы крови) на пленке политетрафторэтилена до и после привив-

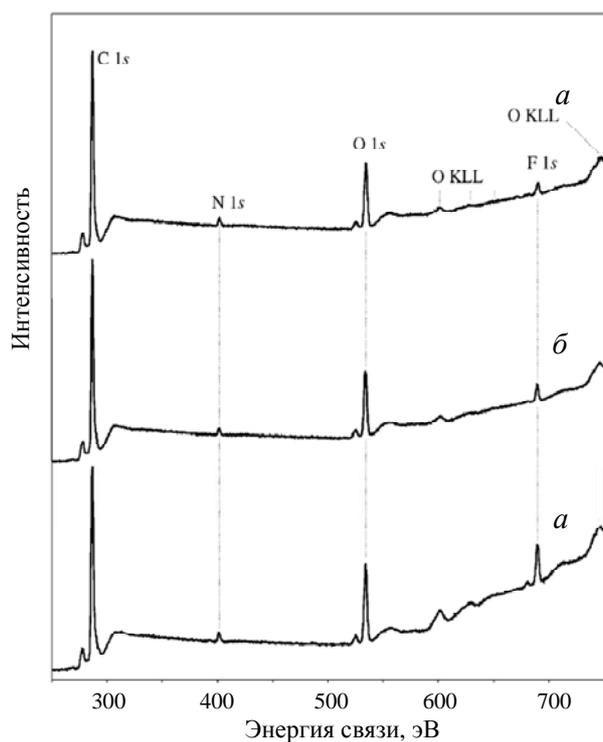


Рис. 1. РФЭС спектры политетрафторэтилена, модифицированного обработкой в кислородной плазме с последующей УФ-иницированной прививкой моноакрилата полиэтиленоксида.

Спектры сняты при углах анализатора 0° (а), 45° (б) и 60° (в)

ки полиэтиленоксида. На рис. 1 представлены РФЭС спектры привитого образца, снятые с разной глубины поверхностного слоя. Основными пиками в спектре являются $C1s$ и $O1s$ в соотношении, характерном для атомного содержания углерода и кислорода в полиэтиленоксиде, а также присутствует пик $F1s$, относительная интенсивность которого уменьшается практически до нуля при минимальной глубине анализируемого слоя, достигаемой при угле падения луча 60° , что свидетельствует о сплошном покрытии политетрафторэтилена слоем привитого полиэтиленоксида. По угловой зависимости интенсивности пиков $F1s$ и $O1s$ была определена толщина привитого слоя, которая составила 4—6 нм в зависимости от условий прививки. Угол смачивания растекающейся капли деионизованной воды на привитом образце составил 11° по сравнению с углом смачивания 100° , наблюдаемым для исходного образца, что показывает существенное увеличение поверхностной энергии в результате модифицирования.

Для оценки гемосовместимости обработанного фторполимера исследовали кинетику адсорбции фибриногена до и после модифицирования. Из кинетических кривых адсорбции (рис. 2) видно, что после модифицирования поверхности полимера количество адсорбированного фибриногена уменьшается более чем на порядок величины, что свидетельствует о повышении гемо-

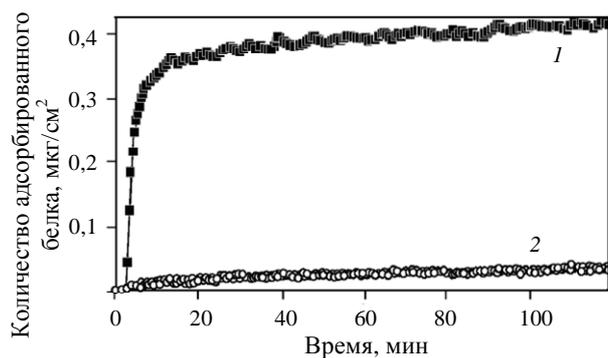


Рис. 2. Кинетические кривые адсорбции фибриногена на поверхности политетрафторэтилена до (1) и после (2) прививки полиэтиленоксида

совместимости фторполимера на стадии адсорбции белков.

Плазмохимическое структурирование и нанесение гемосовместимых покрытий

Другим перспективным методом повышения гемосовместимости фторуглеродных полимеров является плазмохимическое нанесение наноструктурированных [15] или допированных азотом [16, 17] углеродных покрытий. Нанесение аморфного углерода, а также алмазоподобного углерода на поверхность медицинских полимеров приводит к улучшению как их механических характеристик, так и биосовместимости. В частности, было показано, что такие покрытия обладают высокой гемосовместимостью и представляют интерес для ортопедии [18].

Нанесение углеродных покрытий на фторполимеры обычно осуществляют в два этапа. На первом этапе поверхность полимера обрабатывается в плазме для очистки поверхности и повышения ее адгезионной способности. На втором этапе производится либо плазменное распыление углеродной мишени, либо плазменное осаждение углерода из газовой фазы, содержащей углеводородные соединения.

Так, в работе [15] на первом этапе модифицирования поверхность политетрафторэтилена обрабатывали в ионно-плазменном источнике [19] в среде CF_4 в течение 30 мин, что приводит к наноструктурированию поверхности. На втором этапе алмазоподобное покрытие наносили методом ионно-плазменного осаждения углерода из паров циклогексана. Толщина покрытия составила 10 и 100 нм. Условия ионно-плазменной обработки поверхности на первом этапе: напряжение $U = 2$ кВ, ток разряда $I = 200$ мА, давление CF_4 10^{-1} Па; условия нанесения пленок на втором этапе: напряжение $U = 3$ кВ, ток разряда $I = 200$ мА, давление циклогексана 10^{-1} — 10^{-2} Па. Образцы исследовали методами сканирующей электронной микроскопии с энергодисперсионным анализом, атомно-силовой микроскопии, РФС, а также по изменению углов смачивания. Гемосовместимость оце-

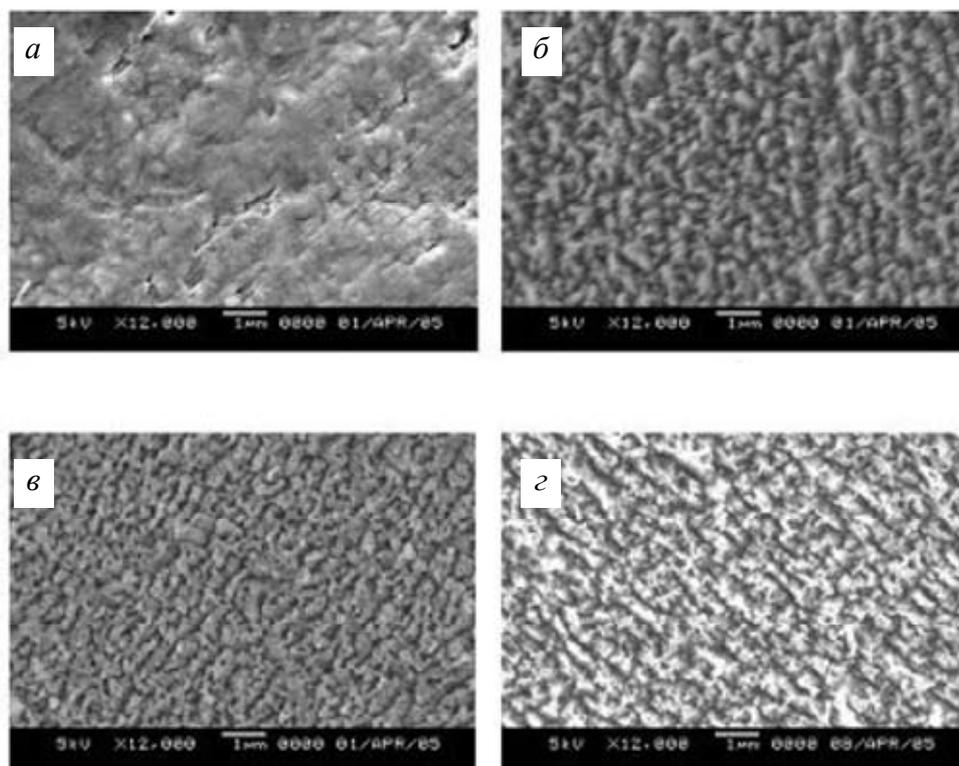


Рис. 3. Микрофотографии поверхностей исходного образца политетрафторэтилена (ПТФЭ) и после ионно-плазменной обработки.

Сканирующий электронный микроскоп JSM_6360 LA (JEOL, Япония), увеличение $\times 2000$.

a — ПТФЭ исходный, *б* — ПТФЭ обр(30 мин), *в* — ПТФЭ обр(30 мин)/C10 нм, *г* — ПТФЭ обр(30 мин)/C100 нм

нивали по параметрам адсорбции альбумина (компонент сыворотки крови) и адгезии тромбоцитов к модифицированной поверхности биополимера.

На рис. 3 представлены микрофотографии поверхностей исходного и обработанных в ионно-плазменном источнике образцов политетрафторэтилена (ПТФЭ); обозначение модифицированных образцов: ПТФЭ-обр(30мин) — обработка в течение 30 мин в плазме CF_4 , ПТФЭобр(30мин)/C10нм — обработка 30 мин в плазме CF_4 с последующим нанесением углеродного покрытия толщиной 10 нм, ПТФЭобр(30мин)/C100нм — обработка 30 мин в плазме CF_4 с нанесением углеродного покрытия толщиной 100 нм. В отличие от исходной поверхности полимера (рис. 3 *a*) модифицированные поверхности имеют четко выраженные упорядоченные фибриллярные микроструктуры с размером фибрилл порядка 200—500 нм (рис. 3 *б—г*). Размер микронеровностей не зависит от наличия и толщины углеродного покрытия, следовательно, характерная рельефная микроструктура поверхности определяется на первой стадии обработки полимера.

Анализ наноструктуры поверхности этих же образцов методом атомно-силовой микроскопии показал, что среднеквадратичная шероховатость растет после обра-

ботки полимера в плазме CF_4 с 24 ± 1 нм (для исходного образца) до 31 ± 2 нм (для образца ПТФЭ обр(30мин)). Нанесение углеродной пленки влияет на наноразмерную неоднородность. С ростом толщины углеродного покрытия шероховатость поверхности полимера достоверно увеличивается с 37 ± 2 нм (толщина пленки 10 нм) до 67 ± 4 нм (толщина 100 нм).

Обработка плазмой CF_4 приводит к увеличению гидрофобности поверхности политетрафторэтилена. Угол смачивания по воде θ возрастает от $111 \pm 2^\circ$ до $138 \pm 4^\circ$. Следующее за поверхностным травлением нанесение углеродного покрытия толщиной 10 нм ведет к уменьшению угла смачивания ($\theta = 123,5 \pm 4^\circ$). При толщине углеродного слоя 100 нм краевой угол смачивания значительно уменьшается (до $86 \pm 6^\circ$). Это свидетельствует о том, что толщине углеродного слоя в 100 нм на поверхности обработанного плазмой политетрафторэтилена соответствует практически сплошное углеродное покрытие.

Измерение химического состава поверхности полимера (метод РФЭС) на различных этапах его модифицирования показало, что обработка в CF_4 приводит к увеличению относительного содержания фтора в поверхно-

стном слое до $[F] : [C] = 1,96$ по сравнению с исходным значением 1,86 для необработанного полимера. Последующее нанесение углеродного слоя толщиной 10 нм значительно снижает относительное содержание фтора в поверхностном слое до 0,46, а при толщине покрытия 100 нм относительное содержание фтора в анализируемом слое снижается до 0,08, при этом содержание углерода возрастает, что и обуславливает существенное уменьшение угла смачивания.

Исследована зависимость количества необратимо адсорбированного альбумина от степени гидрофильности и от шероховатости поверхности полимера. Наименьшее количество белка ($10,8 \pm 2,2$ нг/см²) адсорбируется поверхностью образца ПТФЭобр(30мин)/С100, имеющего наибольшую степень гидрофильности ($\theta = 86 \pm 6^\circ$). С увеличением угла смачивания (гидрофобности поверхности) от $111 \pm 2^\circ$ до $138 \pm 4^\circ$ количество адсорбированного альбумина возрастает с $50,9 \pm 12,12$ до $106,38 \pm 12$ нг/см². Что касается зависимости количества необратимо адсорбированного альбумина от среднеквадратичной шероховатости, то минимальное содержание адсорбированного белка ($10,8 \pm 2,2$ нг/см²) регистрируется на поверхности ПТФЭобр(30мин)/С100 с наибольшей среди исследованных образцов шероховатостью (67 ± 4 нм). Известно, что адсорбция белков является первой стадией взаимодействия крови с чужеродной поверхностью и во многом определяет характер дальнейших процессов [1]. На примере ряда полимерных материалов было показано, что чем больше гидрофобность поверхности, тем больше площадь адсорбции [1]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что обработка поверхности политетрафторэтилена плазмой CF₄ с последующим нанесением алмазоподобного покрытия толщиной 100 нм приводит к существенному уменьшению количества необратимо адсорбированного белка по сравнению с исходным полимером, увеличивая тем самым гемосовместимость материала.

Анализ адгезии тромбоцитов показал, что плазменная обработка и последующее напыление углерода не влияют на общее количество адгезированных тромбоцитов по сравнению с адгезией к поверхности исходного образца. Вместе с тем по данным морфологического анализа поверхности образцов и оценки константы активации тромбоцитов K_a доля ее сильно активированных форм (распластанных и агрегатов), которая практически одинакова для исходного и обработанного в плазме CF₄ образцов политетрафторэтилена ($K_a = 0,73 \pm 0,07$ и $K_a = 0,71 \pm 0,07$, соответственно), значительно уменьшается при нанесении углеродного покрытия ($K_a = 0,56 \pm 0,06$ для образца ПТФЭобр(30мин)/С10 и $K_a = 0,42 \pm 0,04$ для образца ПТФЭобр(30мин)/С100).

Таким образом, углеродное покрытие толщиной 100 нм в наименьшей степени вызывает поверхностную агрегацию тромбоцитов человека. Изучение зависимости активации тромбоцитов от степени гидрофильности поверхности показало, что минимальная доля распластанных форм и агрегатов клеток в общем количестве

адгезированных тромбоцитов наблюдается для поверхности образца с наибольшей гидрофильностью (ПТФЭобр(30мин)/С100). В отношении влияния на показатель степени активации клеток шероховатости полимерной поверхности установлено, что наибольшее количество сильно активированных форм адгезированных тромбоцитов ($K_a = 0,73 \pm 0,13$) соответствует наименьшему значению шероховатости (24 ± 1 нм). С ростом шероховатости величина K_a снижается, принимая минимальное значение $0,42 \pm 0,09$ при среднеквадратичной шероховатости 67 ± 4 нм (она характерна для поверхности политетрафторэтилена после плазменной обработки и нанесения алмазоподобной пленки толщиной 100 нм).

Суммируя полученные результаты можно сделать вывод, что модифицирование поверхности политетрафторэтилена плазмой CF₄ с последующим нанесением алмазоподобного углеродного покрытия толщиной 100 нм приводит к значительному уменьшению количества необратимо адсорбированного белка и доли сильно активированных тромбоцитов, тем самым снижается риск тромбозов при контакте биоматериала с кровью.

Нанесение допированных азотом алмазоподобных пленок на образцы политетрафторэтилена осуществляли в плазмохимическом реакторе путем распыления графита в разряде с накалимым катодом в атмосфере аргона с примесью азота (3–40%) [17]. Температура образца составляла 180–210 °С в зависимости от условий горения разряда и температуры накалимого катода. Общее давление и суммарный газовый поток во всех случаях поддерживали постоянными и равными соответственно $5 \cdot 10^{-2}$ мм рт.ст. и 25 см³/мин (при н.у.). Исходные образцы обрабатывали в плазме чистого аргона, после нанесения углеродного покрытия образцы охлаждали до комнатной температуры в потоке аргона с целью предотвращения окисления нанесенного покрытия. Азотсодержащие группы в углеродной пленке идентифицировали методом ИК-фурье-спектроскопии. На рис. 4 пред-

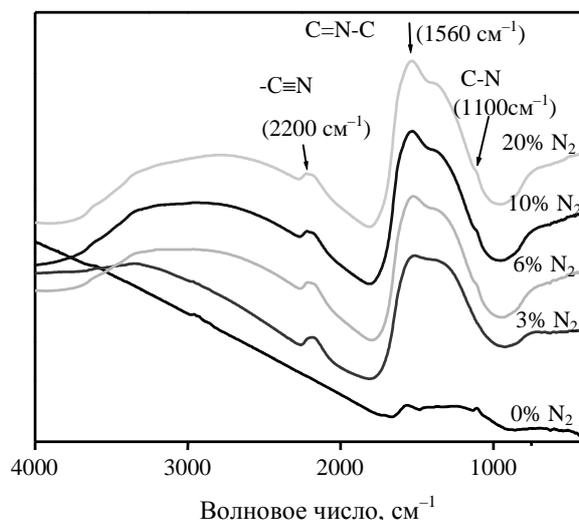


Рис. 4. ИК спектры пропускания допированных азотом углеродных пленок на поверхности политетрафторэтилена

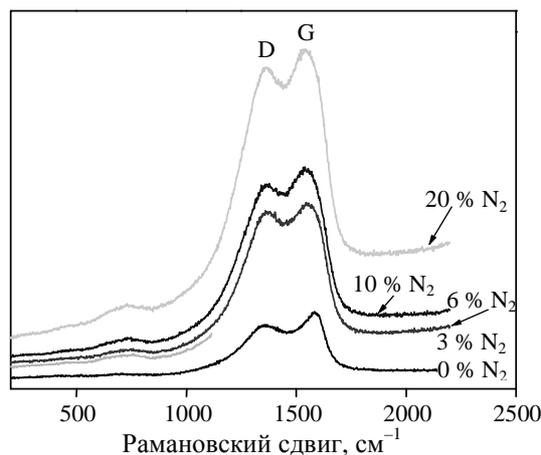


Рис. 5. Рамановские спектры пропускания допированных азотом углеродных пленок

ставлены ИК спектры пропускания углеродных пленок, полученных при различной концентрации азота в плазме. Широкая полоса поглощения в диапазоне 1000—1700 см^{-1} , появляющаяся и растущая с увеличением концентрации азота в плазме, приписывается валентным колебаниям —C—C— групп. Обычно эта полоса не проявляется в ИК спектрах чистого углерода, а детектируется только в рамановском спектре и обусловлена высокой симметрией шестичленного углеродного кольца и отсутствием дипольного момента. Однако допирование азотом нарушает симметрию, что и приводит к возникновению дипольного момента и к проявлению G (1575 см^{-1}) и D (1360 см^{-1}) линий углерода в ИК спектре допированной углеродной пленки.

Появление в ИК спектре максимумов при 2200, 1560 и 1100 см^{-1} отвечает группам $\text{—C}\equiv\text{N}$, —C=N—C— и —C—N в допированной углеродной пленке [21].

В рамановских спектрах (рис. 5) также проявляются линии поглощения G (1575 см^{-1}) и D (1360 см^{-1}) углерода, характерные для алмазоподобных пленок. В соответствии с проведенными измерениями скорость нанесения углеродной пленки возрастает с увеличением концентрации азота в плазме. Так как глубина зондирования в методе рамановской спектроскопии сравнима с толщиной пленки (100—500 нм), то интенсивность D и G линий также растет с увеличением содержания азота в плазме.

На рис. 6 представлены спектры потерь энергии электронов для допированных азотом углеродных пленок. Энергия первичного пучка электронов в этом случае составляла 1000 эВ. Все спектры содержат упругий пик с энергией, равной энергии первичного пучка, а также пики, соответствующие плазмонному возбуждению всех валентных электронов (высокоэнергетичный $\delta+\pi$ плазмонный пик) и только π -электронов (низкоэнергетичный π -плазмонный пик).

Интенсивности и положения плазмонных пиков были рассчитаны нами после стандартной процедуры вычета фона и упругого пика путем фиттинга их гауссовскими функциями. Используя процедуру расчета,

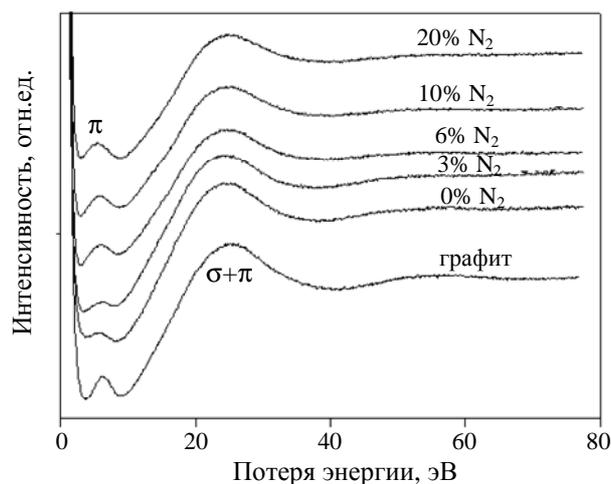


Рис. 6. Спектры энергетических потерь электронов для алмазоподобных пленок, полученных при различной концентрации азота в плазме в смеси $\text{Ar} + \text{N}_2$

подробно описанную ранее в [16], нами были найдены значения доли sp^3 гибридизации углерода и плотности углеродной пленки.

Установлено, что значительная фракция sp^3 -гибридизованного углерода (около 60%) присутствует в алмазоподобной пленке, полученной при низком содержании азота (0—3%) в плазме. С увеличением концентрации азота в разряде количество sp^3 -связанного углерода уменьшается до 20%. Относительное содержание sp^3 -фракции пропорционально прочности и износостойкости алмазоподобной пленки. Удельная плотность полученных пленок практически не зависит от концентрации азота в разряде. Величина измеренной удельной плотности выше наблюдаемой для полимерных пленок (около 1 г/см^3), однако ниже, чем у графита (2,25 г/см^3).

Изучен также химический состав полученных пленок, измеренный методом РФС на поверхности и определенный в объеме методом послойного стравливания в оже-спектрометре. Интересно отметить, что концентрация азота на поверхности быстро достигает предельного значения 30,7 % ат. с увеличением содержания азота в плазме. Присутствие довольно значительного количества кислорода на поверхности (10—14 % ат.), по-видимому, связано с пост-процессами окисления свободных радикалов и других активных частиц, образующихся при формировании углеродной пленки в плазме. Послойный химический анализ методом оже-спектроскопии показывает, что предельная концентрация азота в объеме пленки (12,6 % ат.) значительно ниже, чем на поверхности (30,7 % ат.). Возможным объяснением этому может быть сегрегация азота из объема на поверхность при медленном охлаждении пленки в потоке аргона. Вероятно, термодинамически равновесная концентрация азота в объеме при комнатной температуре не может быть выше, чем полученная нами величина, что и приводит к вытеснению азотсодержащих групп на поверхность пленки при медленном охлаждении.

Для исследования гемосовместимости фторполимерных материалов были проведены измерения параметров адгезии тромбоцитов к поверхности политетрафторэтилена до и после нанесения допированных азотом алмазоподобных пленок. Измеряли общее количество адгезированных тромбоцитов и относительные количества различным образом активированных тромбоцитов: одиночные слабо активированные, тромбоциты с псевдоподиями (отростками), распластанные и агрегированные. Повышение гемосовместимости полимера ассоциируется как с уменьшением общего количества адгезированных тромбоцитов, так и с меньшей их активацией. Это подтвердили результаты наших экспериментов. На поверхности алмазоподобной пленки регистрируются в основном одиночные неактивированные тромбоциты и значительно меньшее, чем на исходном полимере, количество активированных, распластных и агрегированных тромбоцитов (рис. 7). Минимальная активация тромбоцитов наблюдается на алмазоподобных пленках, полученных при 3%-ом содержании азота в плазме. В такие пленки включается 23,8% (ат.) азота, и они характеризуются относительно высоким содержанием sp^3 -гибридизованного углерода (62%).

Измерения времени свертывания тромбоцитов и индекса тромбогенности материала показали, что углеродное покрытие не оказывает существенного влияния на эти параметры. Многообещающие результаты были получены при исследовании процессов роста клеток эндотелия до и после нанесения покрытия. Анализ морфологии роста клеток эндотелия проводили через 72 ч после их посева на образцах. По истечении этого времени лишь небольшое количество клеток было обнаруже-

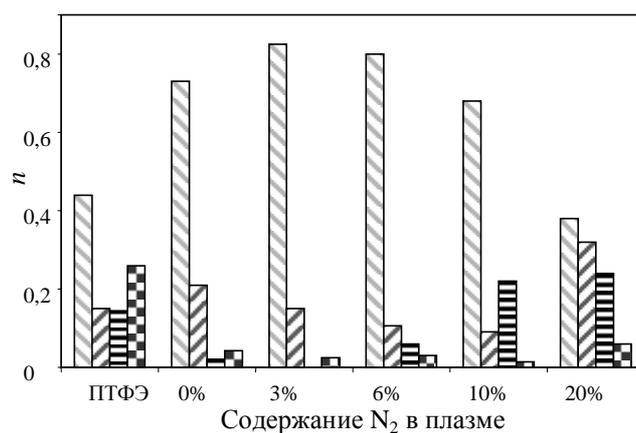


Рис. 7. Относительное количество n различным образом активированных тромбоцитов на углеродных алмазоподобных пленках, полученных при различной концентрации азота в плазме.

Для сравнения приведены данные для исходного, необработанного политетрафторэтилена.

□ — одиночные клетки; ▨ — псевдоподийные; ▨ — распластанные; ▨ — агрегированные

но на поверхности исходного политетрафторэтилена, тогда как на поверхности алмазоподобной пленки был зафиксирован сплошной монослой эпителиальных клеток (рис. 8). Таким образом, допирование азотом алмазоподобных пленок значительно облегчает процесс формирования антитромбогенного слоя клеток эпителия, имитирующего поверхность реального кровеносного сосуда. Анализ взаимодействия допированных азотом

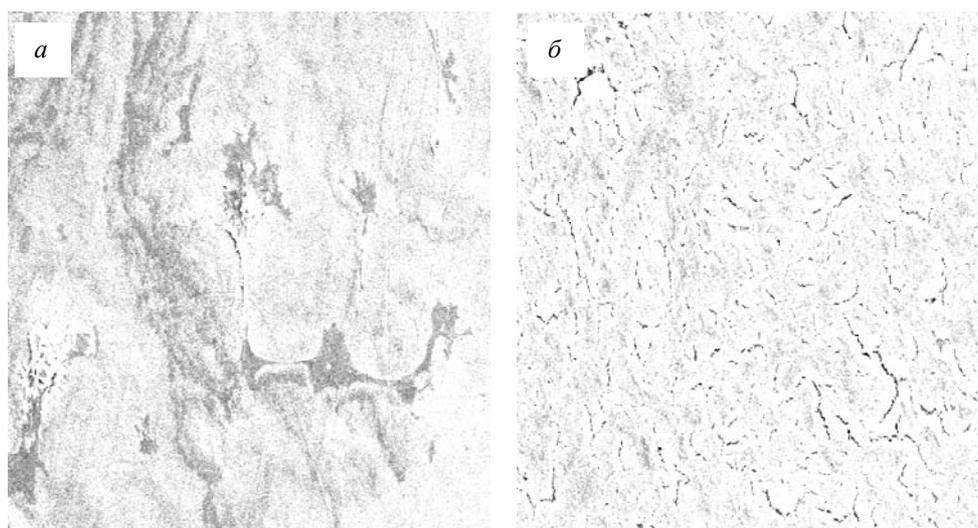


Рис. 8. Микрофотографии, демонстрирующие рост клеток эндотелия на исходном образце политетрафторэтилена (а) и образце, покрытом допированной алмазоподобной пленкой (б).

Сканирующий электронный микроскоп; увеличение $\times 200$, метка 100 мкм. Длительность роста клеток 72 ч

алмазоподобных пленок с цельной кровью показал, что такое покрытие существенно снижает вероятность образования фибриновой матрицы, что также положительно сказывается на тромборезистентности материала.

Плазмонизируемая иммобилизация белков

Иммобилизация белков на поверхность фторуглеродных материалов представляет большой интерес для создания высокостабильных биосенсоров [22], биосепараторов [23] и активных имплантатов последнего поколения [24]. В литературе описаны преимущественно химические методы иммобилизации ряда белков: гепарина [25], урокиназы [26] и тромбомодулина человека [27]. Недостатком этих методов является необходимость индивидуального подбора цепочки химических реакций для каждой конкретной системы и неэкологичность жидкостных химических процессов иммобилизации. В связи с этим большие перспективы открывают универсальные вакуумные плазмохимические технологии, которые позволяют модифицировать поверхность любых полимеров путем прививки и иммобилизации различных белков в экологически чистых условиях.

Примером реализации такой технологии является обработка политетрафторэтилена в микроволновой плазме CO_2 с последующей прививкой акриловой кислоты и иммобилизацией тромбомодулина человека [28]. Этот белок представляет собой эндотелиальный гликопротеин. Он обладает сильными антитромбогенными свойствами, эффективно ингибируя преобразование фибриногена в фибриновую матрицу и тем самым предотвращая процесс тромбообразования.

Образцы политетрафторэтилена обрабатывали в микроволновой плазме (частота 2,45 ГГц) в потоке CO_2 (5—15 $\text{см}^3/\text{мин}$ при н.у.) при давлении 0,05—0,15 мм рт.ст. Затем образцы выдерживали в насыщенных парах акриловой кислоты при температуре 20 °С в течение 1—4 ч. Для удаления непривитой фракции полиакриловой кислоты образцы промывали в дистиллированной воде с температурой 75 °С в течение 24 ч. Иммобилизацию тромбомодулина человека осуществляли, используя водорастворимый карбодиимид. Для этого образцы с привитой акриловой кислотой помещали в раствор карбодиимида (10 мг/мл) на 30 мин при температуре 4 °С, промывали в деионизованной воде и затем помещали в фосфатный буферный раствор (1 мл, pH = 7,4), содержащий 24 мкг тромбомодулина. Реакцию проводили при 4 °С в течение 24 ч.

Химический состав полученных образцов анализировали методами ИК-фурье-спектроскопии многократного полного внутреннего отражения, РФЭС, ЭПР, измерением угла смачивания и Z-потенциала [28]. На рис. 9 показаны ИК спектры поверхностного слоя образцов на различных этапах обработки. В ИК спектре образца после обработки в плазме CO_2 появляются пики 1881 и 1725 см^{-1} , приписываемые образующимся фторальдегидным группам COF и двойным связям $\text{CF}_2=\text{CF}_2$, соответственно. Прививка акриловой кислоты приводит

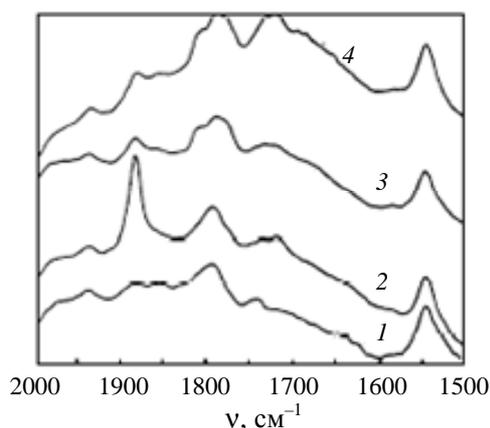


Рис. 9. ИК-фурье-спектры пленок политетрафторэтилена на различных этапах его обработки:

1 — исходный образец; 2 — после обработки в плазме CO_2 ; 3 — после прививки акриловой кислоты; 4 — после иммобилизации тромбомодулина человека

к появлению пиков 3200 см^{-1} (OH), 1710 см^{-1} (C=O) и 800 см^{-1} (COOH). Вместе с тем наблюдается снижение интенсивности полосы 1881 см^{-1} , отвечающей поглощению фторальдегидных групп COF, что свидетельствует о расходовании этих групп, являющихся, по-видимому, активными центрами прививки акриловой кислоты. Отсутствие заметных изменений в ИК спектре после иммобилизации тромбомодулина можно связать с малым общим количеством привитого белка. Количество привитой акриловой кислоты определяли как взвешиванием, так и по ИК спектрам поглощения по полосе 800 см^{-1} . В зависимости от условий плазменной обработки и длительности прививки это количество составляло от 3 до 10 $\text{мкг}/\text{см}^2$.

Анализ спектров РФС высокого разрешения пика $\text{C}1s$ позволяет идентифицировать COF, CH, COOH и другие группы, образующиеся в поверхностном слое на различных этапах модифицирования образца. По росту интенсивности пика с максимумом 285,0 эВ, отвечающего CH-группе, можно количественно охарактеризовать содержание сформированных углеводородных слоев на фторуглеродной подложке на различных этапах модифицирования — прививке акриловой кислоты и иммобилизации тромбомодулина. Снижение интенсивности пика $\text{F}1s$ свидетельствует об уменьшении фторуглеродной компоненты в поверхностном слое более чем в два раза.

Существенным моментом является сохранение биологической активности белков в иммобилизованном на поверхности состоянии. Биологическую активность иммобилизованного на поверхности политетрафторэтилена тромбомодулина оценивали тестированием на способность его активировать протеин С. Активация протеина С при биологическом воздействии тромбомодулина сопровождается образованием аминотетракумарина, который обладает характерной флуоресценцией на длине волны 440,8 нм, возбуждаемой светом с длиной волны 380 нм.

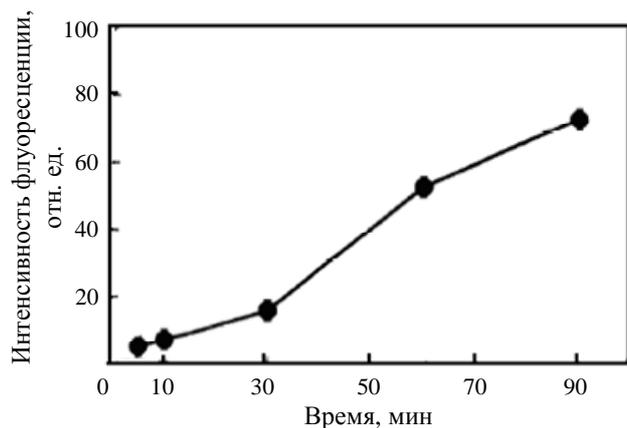


Рис. 10. Изменение во времени интенсивности флуоресценции на длине волны 440,8 нм, характерной для аминотетраметилкумарина в растворе протеина С в присутствии тромбомодулина, иммобилизованного на поверхности политетрафторэтилена

Рис. 10 демонстрирует кинетику роста сигнала флуоресценции на длине волны 440,8 нм в растворе С протеина в присутствии тромбомодулина, иммобилизованного на подложке из политетрафторэтилена. Эти данные являются прямым доказательством сохранения биологической активности белка, иммобилизованного на поверхности политетрафторэтилена с применением плазмохимической технологии.

Заключение

Плазмохимические технологии открывают широкие возможности для модифицирования фторуглеродных полимеров с целью создания на их основе новых медицинских полимеров для сердечно-сосудистой хирургии, обладающих высокой гемосовместимостью.

Разнообразные методы современной плазмохимии, такие как обработка в плазме и плазмохимическое нанесение, плазмоиницированная прививка и иммобилизация биологически активных соединений, в сочетании с достижениями фторполимерной химии позволяют создавать гемосовместимые материалы нового поколения с заданными структурой, составом и биологическими свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 08-03-00345)

ЛИТЕРАТУРА

1. Биосовместимость. Под ред. В.И. Севастьянова. М.: ИЦ ВНИИГС, 1999, с. 367.
2. Севастьянов В.И. Вест. трансплантологии и искусственных органов, 2001, № 3-4, с. 123—131.

3. Chu P.K., Chen J.Y., Wang L.P., Huang, N. Mater. Sci. Eng., 2002, v. R36, p. 143.
4. Poncin-Epaillard F., Legeay G. J. Biomat. Sci. Polym. Edn., 2003, v. 14, № 10, p. 1005.
5. Василец В.Н., Кузнецов А.В., Севастьянов В.И. Химия высоких энергий, 2006, т. 40, с. 105—111.
6. Vasilets V.N., Kusnetsov A.V., Sevastianov V.I. J. Biomed. Mater. Res., 2004, v. 69A, p. 428.
7. Sevastianov V.I. In: High-Performance Biomaterials. Ed. M. Szycher. Pennsylvania Technomic Publ. Co., Inc., Chapter 21, 1991, p. 245—253.
8. Байдаровцев Ю.П., Василец В.Н., Пономарёв А.Н. Химическая физика, 1985, т. 4, № 1, с. 89—96.
9. Simon F., Hermel G., Lunkwitz D., Werner C., Eichhorn K., Jacobasch H.J. Macromol. Symp., 1996, v.103, p. 243—257.
10. Klee D., Hocker H. Adv. Polym. Sci., 1999, v.149, p. 1—57.
11. Zhang F., Kang E.T., Neoh K.G., Wang P., Tan K.L. J. Biomed. Mat. Res., 2001, v. 56, p. 324—332.
12. Lee J., Kopecek J., Andrade J.D. Ibid., 1989, v. 23, p. 351—386.
13. Amiji M., Park K. J. Biomat. Sci. Polym. Edn., 1993, № 1, p. 217—234.
14. Vasilets V.N., Werner C., Hermel G., Pleul D., Nitschke M., Meming A, Janke A, Simon F. J. Adhes. Sci. Technol., 2002, v. 16, p. 1855—1868.
15. Ремеева Е.А., Розанова И.Б., Елинсон В.М., Севастьянов В.И. Перспективные материалы, 2007, № 5, с. 1—9.
16. Vasilets V.N., Hirose A., Yang Q., Singh A., Sammynaiken R., Foursa M., Shulga Y.M. Applied Physics A: Materials Science & Processing, 2004, v. 79, № 8, p. 2079—2084.
17. Vasilets V.N., Hirose A., Yang Q., Singh A., Sammynaiken R., Shulga Yu.M., Kuznetsov A.V., Sevastianov V.I. In: Plasma Processes and Polymers. Eds R. d'Agostino, P. Favia, C. Oehr, M. R. Wertheimer. Wiley-VCH, Germany, 2005, p. 65—76.
18. Hauert R. Diam. Rel. Mater., 2003, v. 12, p. 583—589.
19. Елинсон В.М., Слепцов В.В., Лямин Ф.Н. Матер. научно-технической конференции «Вакуумная наука и техника». Сентябрь, 2004, с. 214—218.
20. Cezeaux J.L., Romoser C.E., Benson R.S., Buck C.K., Sackman J.E. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B, 1998, v. 141, № 1—4, p. 193—196.
21. Socrates G. Infrared Characteristics Group Frequencies. Tables and charts. John Willey & Sons, 2-nd ed., 1994, 587p.
22. Frew J.E., Hill H.A.O. Anal. Chem., 1987, v. 59, p. 933—944.
23. Behm E., Ivanovich P, Klinkman H. Int. J. Artif. Organs., 1988, v. 12, p. 1—10.
24. Ishihara K. In: Biomedical Applications of Polymer Materials. Ed. T. Tsuruta. CRC Press, Boca Raton, 1993, p. 89—116.
25. Ito Y., Sisido M., Imanishi Y. J. Biomed. Mater. Res., 1986, v. 20, p. 1017—1033.
26. Oshiro T., Kasaki G. Artif. Organs., 1980, v. 4, p. 58—64.
27. Kishida A., Ueno Y., Maruyama I., Akashi M. ASAIO Journal, 1994, v. 40, p. M840—M845.
28. Vasilets V.N., Hermel G., Konig U., Werner C., Muller M., Simon F., Grundke K., Ikada Y., Jacobasch H.-J. Biomaterials, 1997, v.18, p. 1139—1145.