

ПОЛИУРЕТАН ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ, МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ПЛАЗМЕННО-ИОННОЙ ОБРАБОТКОЙ

© 2018 г. В.С. Чудинов*, И.В. Кондюрина**, И.Н. Шардаков*, А.Л. Свистков*,
И.В. Осоргина***, А.В. Кондюрин****

*Институт механики сплошных сред УрО РАН, 614013, Пермь, ул. Академика Королева, 1

**Школа медицины, Сиднейский университет, Сидней, Австралия

***Пермский государственный национальный исследовательский университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

****Школа физики, Сиднейский университет, Сидней, Австралия

E-mail: chudinovsl@mail.ru

Поступила в редакцию 27.03.18 г.

Полиуретан медицинского назначения обрабатывали ионами азота с энергией 20 кэВ и флюенсом 10^{14} – 10^{16} ионов/см². Модифицированный полиуретан содержит слоистую структуру, состоящую из карбонизованного слоя толщиной около 70 нм и частично деполимеризованного слоя, расположенного ниже карбонизованного. Высокая активность за счет свободных радикалов обеспечивает стабильную адсорбцию белка на поверхности полиуретана с образованием ковалентной связи. Повышенная гидрофильность поверхности модифицированного полиуретана обеспечивает сохранение биологической активности адсорбированного белка. Это способствует адсорбции и пролиферации эндотелиальных клеток на поверхности полиуретана, что важно для использования модифицированного полиуретана как материала для имплантатов мягких тканей.

Ключевые слова: биосовместимость, имплантат, полиуретан, ионно-плазменная обработка, карбонизованный слой.

В последнее время применение полимерных эндопротезов в организме человека становится актуальной задачей, позволяющей решить ряд проблем с замещением или улучшением функциональности органов, позволяя улучшить качество жизни, особенно в условиях увеличения сроков активной жизни населения [1–5]. Для применения в качестве эндопротезов весьма перспективны полиуретаны [6–11]. Спектр механических свойств полиуретанов широк – от жестких компактных изделий для замещения дефектов костей до тонкостенных пленочных оболочек эндопротезов с различными наполнителями для замещения мягких тканей [12–14].

Однако современные материалы, в том числе и полиуретаны, при попадании в организм распознаются иммунной системой организма как инородное тело, а затем изолируются коллагеновой, а далее и кальцинированной оболочкой. Чрезвычайно важной проблемой при этом является длительное сохранение стерильности введенных в организм имплантируемых устройств, поскольку их бактериальное зара-

жение с обрастанием биопленками приводит к неминуемому отторжению с потерей их функциональности [15,16]. Общими требованиями ко всем живляемым материалам являются их биоинертность, т.е. способность сохранять свои рабочие свойства в течение длительного времени и не оказывать влияния на окружающие ткани и на организм в целом, обладать необходимыми физико-химическими и механическими свойствами для выполнения требуемых функций.

Наиболее широко для создания эндопротезов применяются силоксановые каучуки, удовлетворяющие большинству этих требований, но они имеют существенный недостаток – сравнительно низкую прочность. Кроме того, силоксановые материалы выделяют низкомолекулярные фракции в организм, и нет неопровержимых доказательств, что накапливаемые силоксановые фракции в разных частях организма не влияют на его функциональность.

В нашей лаборатории работы по созданию имплантатов на основе полиуретанов ведутся с начала 90-х годов XX века [17]. Созданное поколение полиуретанов медицинского применения успешно применялось для изготовления

Сокращение: МНПВО – многократно нарушенное полное внутреннее отражение.

маммапротезов, пястно-фалангового протеза, протезов диафрагмы и тестикул. Анализ клинических испытаний в течение 20 лет показал положительные результаты для полиуретана, синтезированного на основе простого олигоэфира, толуилендиизоцианата и ароматического диамина. Для модификации поверхности полиуретанового протеза применяли ионно-лучевую обработку высокоэнергетическими ионами азота [17–26], что позволило значительно уменьшить реакцию образования коллагеновой капсулы [27]. Дальнейшие исследования показали, что механизм уменьшения реакции организма основан на адсорбции белков организма за счет реакций со свободными радикалами, стабилизированными на краях углеродных кластеров типа графита и графена, формируемых во время ионно-лучевой обработки [28,29]. При этом образуется сплошной белковый слой на поверхности полимера, и активная конформация белков сохраняется. Данные исследования были проведены на широком ряде полимерных материалов, белков и клеточных культур [30–31].

В данной работе рассматривается использованный нами ранее в качестве материала для эндопротезов полиуретан медицинского назначения, который модифицируется плазменно-ионной обработкой ионами азота высокой энергии. Представлено подробное описание всех этапов синтеза полиуретана, а также анализ совокупности результатов физических экспериментов, обосновывающих биосовместимость полиуретана, модифицированного плазменно-ионной обработкой для медицинского применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для синтеза полиуретана использовали форполимер на основе простого олигоэфира и 2,4-толуилендиизоцианата. Форполимер отверждался смесью отвердителей МОКА (13,2%), полифурита (84,7%) и Воранола (Лапромола) RA640 (2,1%) смешиванием при температуре 60°C в течение одной минуты и с вакуумированием для удаления пузырьков воздуха в течение 15 мин. После этого пленки полиуретана формировали в чашках Петри в течение 24 ч при комнатной температуре в защищенном от влаги и пыли герметичном боксе. Толщина готовых пленок составляла 0,5 мм. Отжиг пленок производили в термошкафу при температуре 100°C в течение 24 ч. После синтеза пленки отмывали в дистиллированной воде в течение 1 ч и высушивали в термошкафу при температуре 100°C в течение 20 мин.

После синтеза пленку полиуретана помещали в гептан и выдерживали там 1 ч для удаления из пленки низкомолекулярных непрореагировавших остатков исходных компонентов и не связанных макромолекул полиуретана. После этого полиуретан сушили в течение суток в защищенном от попадания пыли контейнере со свободным доступом воздуха. Сушку прекращали при стабилизации веса пленки. Выделение низкомолекулярных фракций регистрировали по весу пленки полиуретана до обработки в гептане и после высушивания. Доля несвязанных фракций составляла 1% от веса пленки. После этой процедуры выделения низкомолекулярных продуктов при повторном вымачивании не наблюдалось в пределах ошибки измерения (0,1%).

Для обработки в плазме плоские образцы полиуретана диаметром 100 мм помещали на металлический плоский держатель, соединенный с высоковольтным источником питания, и закрывали металлической сеткой, соединенной с держателем. Держатель помещали в вакуумный реактор, состоящий из верхней алюминиевой части, стеклянной средней части и нижней части из нержавеющей стали. Откачивание воздуха из реактора осуществляли с помощью винтового безмасляного насоса и турбомолекулярного насоса до давления 10^{-5} торр. Затем реактор заполняли азотом при скорости натекания 75 стандартных см³/мин и поддерживали давление 2 мторр при постоянной продолжающейся откачке насосами. Для создания плазмы использовали генератор, генерирующий сигнал 13,75 МГц с выходной мощностью 100 Вт, который через согласующий блок подавали на антенну, расположенную снаружи стеклянной части реактора. Антенна охлаждалась потоком воздуха от вентилятора. В режиме ручного согласования отраженная мощность составляла 10 Вт. В верхней части реактора располагались электромагнитные катушки, через которые пропусклся постоянный ток от двух источников питания. Магнитное поле подбирали таким образом, чтобы плазма сжималась в столб диаметром 200 мм в верхней части реактора, где находился держатель образцов. Регистрацию плотности плазмы производили пробой Лэнгмюра. Плотность ионов составляла 10^{10} ионов/см³, энергия ионов около 0,01 эВ, энергия электронов 5 эВ. На держатель подавали импульсное высокое напряжение от высоковольтного источника на основе сильноточного тетрода и генератора импульсов. Блок был разработан и изготовлен в ANSTO (Сидней, Австралия). Величина напряжения составляла 20 кВ, длительность импульса – 20 мкс, частота повторения

импульсов – 50 Гц. Средний ток составлял 1,2–1,3 мА.

Плотность потока ионов определяли по спектрам УФ-поглощения полиэтилена и сравнения с известными спектрами полиэтилена, обработанного на ионном имплантере с известной плотностью потока ионов. Согласно определенной плотности потока ионов, полиуретан обрабатывали в течение 40, 80, 400 и 800 с, что соответствует флюенсам 5×10^{14} , 10^{15} , 5×10^{15} и 10^{16} ионов/см². Глубину проникновения ионов в полиуретан рассчитывали с помощью программы TRIM.

Для оценки поверхностной энергии определяли углы смачивания деионизованной водой и дийодометаном на измерителе контактного угла KRUSS (Германия) с видеорегистрацией. Угол смачивания определяли по форме капли, лежащей на поверхности полиуретана. Поверхностную энергию рассчитывали по методу Овенса–Вендта–Рабеля–Кальбе.

Для оценки изменений молекулярной структуры полимера после плазменно-ионной обработки и количества адсорбированного белка на поверхности полиуретана инфракрасные Фурье-спектры многократно нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО) регистрировали на спектрометре Digilab (Австралия) со спектральным разрешением 4 см^{-1} и числом сканов, равным 500. Использовали приставку для МНПВО Harrick (США) с кристаллом германия размером $1 \times 5 \text{ см}^2$ с углом падения луча 45° . Для анализа использовали спектральное программное обеспечение Resolution Pro (<https://www.agilent.com/en/products/software-informatics/molecular-spectroscopy-data-systems/ftir-software/resolutions-pro-ftir-software>) и GRAMS (<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/INF-15000>).

Для сравнительного анализа адсорбции молекул протеинов на поверхности обработанного и контрольного полиуретана готовился раствор бычьего альбумина в фосфатно-солевом буфере с концентрацией 20 мкг/мл. Образцы полиуретана помещали в раствор альбумина в полипропиленовых контейнерах объемом 5 мл и выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч. Одновременно контрольные образцы полиуретана выдерживали в буферном растворе без альбумина. После этого пленки трижды отмывали в буфере в новых полипропиленовых контейнерах с удалением оставшихся капель салфетками Kim-Wipes (Австралия). Первую и последнюю отмывки проводили в течение 10 с каждую, вторую отмывку проводили в течение 60 мин. После этого пленки ополаскивали де-

ионизированной водой, помещали в новые сухие контейнеры и сушили в течение суток при доступе воздуха, но изолированно от попадания пыли. При манипуляциях использовали только отмытые этанолом и высушенные металлические пинцеты, соприкосновение с другими поверхностями или перчатками не допускалось.

Для отмывки альбумина, не связанного ковалентно с поверхностью полиуретана, пленки отмывали в 2%-м растворе додецилсульфата натрия при температуре 70°C в течение часа. После отмывки в детергенте раствор с образцами охлаждали до комнатной температуры, образцы отмывали три раза в деионизованной воде по описанной методике отмывки в буфере и сушили в течение суток при свободном доступе воздуха, но изолированно от попадания пыли.

Для оценки адсорбции клеток к поверхности полиуретана использовали клеточную культуру эндотелиальных клеток выстилки аорты человека. Перед нанесением клеточной культуры образцы стерилизовали ультрафиолетом в течение 10 мин с обеих сторон образца. С этого момента все манипуляции с образцами проводили в стерильных условиях в вытяжном шкафу со стерильным обратным потоком воздуха. Клетки выращивали на обработанных и необработанных в плазме образцах полиуретана и в лунках планшета без образцов (24-луночные планшеты из пластика для тканевой культуры) для контрольных измерений. Для роста клеток использовали среду «MesoEndo Endothelial Cell Media». Концентрация наносимых клеток составляла $2 \cdot 10^4$ клеток на миллилитр. После нанесения клеток на образцы планшет помещали в стерильный инкубатор, поддерживающий температуру 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Клетки инкубировали двое и пятеро суток, после роста их фиксировали.

Фиксацию клеток осуществляли 80%-м раствором этилового спирта в течение 30 мин. Для окрашивания актиновых микрофиламентов использовали меченный флуоресцентный краситель фаллоидин (Phalloidin-TRITC). Непосредственно перед монтированием препарата клетки окрашивали флуоресцентным красителем ДАПИ для визуализации ядер клеток. После окрашивания образцы размещали между двумя предметными стеклами. Для наблюдения окрашенных клеток использовали микроскоп Olympus IX71 с цифровой камерой. Каждый образец фотографировали 10 раз «слепым методом» с объективом $\times 10$. Детальные фотографии распластавшихся клеток делали с объективом $\times 20$. Статистическую обработку изобра-

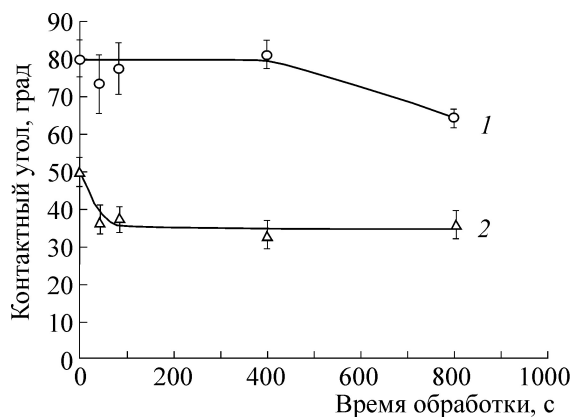


Рис. 1. Угол смачивания водой (1) и диодометаном (2) поверхности полиуретана в зависимости от времени плазменно-ионной обработки.

жений проводили с помощью программы ImageJ (<https://imagej.net>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результат плазменно-ионной обработки визуально проявляется как потемнение поверхности полиуретана, которое усиливается с увеличением времени обработки. Равномерность потемнения поверхности образцов показала однородность распределения потока ионов по поверхности держателя образцов на площади порядка 80 см².

Угол смачивания, измеренный спустя 2 недели хранения образцов на воздухе, меняется после обработки от 80° для необработанного полиуретана до 65–75° для обработанного полиуретана (рис. 1). Угол смачивания диодометаном меняется от 50° для необработанного до 35° для обработанного полиуретана. Соответственно полная поверхностная энергия полиуретана меняется от 40 МДж/м² до 46–53 МДж/м² для разного времени обработки (рис. 2). Значительное изменение поверхностной энергии наблюдается при наибольшем времени обработки (800 с). Дисперсионная часть поверхностной энергии меняется от 34 мДж/м² для необработанного до 42 МДж/м² для обработанного полиуретана. Дисперсионная часть энергии не зависит от времени обработки и вносит наибольший вклад в изменение полной поверхностной энергии после обработки. Полярная часть поверхностной энергии не меняется с увеличением временем обработки от 40 до 400 с, но при обработке с режимом 800 с возрастает от 7 до 12 МДж/м². Таким образом, поверхность полиуретана после обработки становится более гидрофильной.

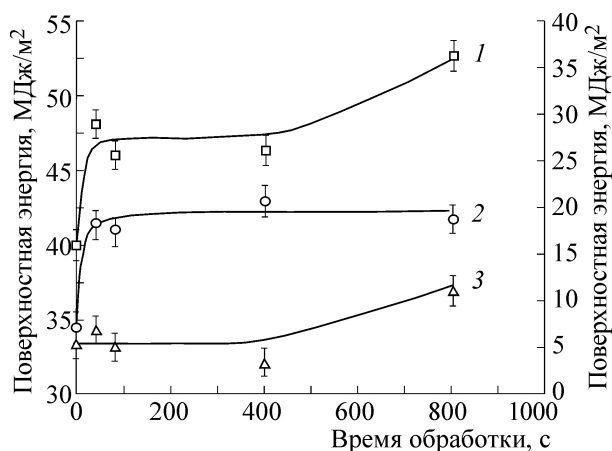


Рис. 2. Полная поверхностная энергия (1) и ее дисперсионная (2) и полярная (3) составляющие полиуретана в зависимости от времени плазменно-ионной обработки. Для полярной составляющей задействована масштабная шкала справа.

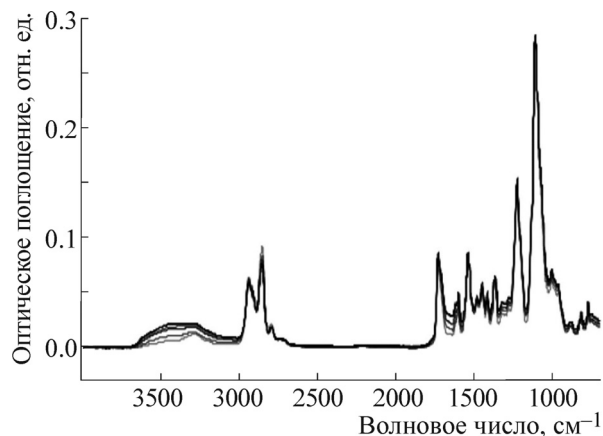


Рис. 3. Фурье-инфракрасные МНПВО спектры полиуретана после плазменно-ионной обработки. Экспериментальные спектры (изменения слабо заметны на фоне сильного спектра полиуретана).

ИК-Фурье-спектры МНПВО полиуретана слабо меняются после обработки по сравнению с интенсивными линиями самого полиуретана (рис. 3). Для более видимых изменений спектр необработанного полиуретана вычитали из спектров полиуретана, обработанного ионами. Это позволило выявить изменения спектра в области перекрытия с интенсивными линиями, отнесенными к колебаниям макромолекул полиуретана. В разностных спектрах наблюдаются: широкие линии колебаний гидроксильных групп в области 3600–3200 см⁻¹ с максимумом 3430 см⁻¹; линия нитрильной группы при 2215 см⁻¹; широкая линия с мультиплетной структурой в области 1750–1500 см⁻¹, отнесенная к колебаниям двойных связей C=O, C=N

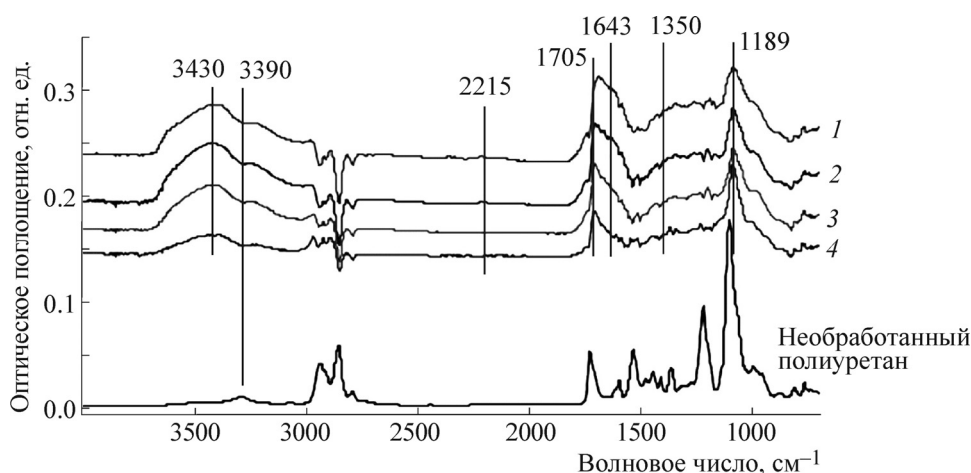


Рис. 4. Фурье-инфракрасные МНПВО спектры полиуретана после плазменно-ионной обработки. Дифференциальные спектры полиуретана с разным временем обработки (спектр необработанного полиуретана вычтен): 1 – 40 с, 2 – 80 с, 3 – 400 с, 4 – 800 с.

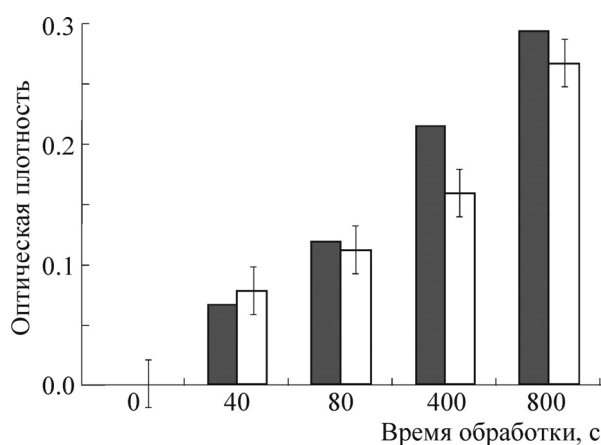


Рис. 5. Оптическая плотность линии C=C-колебаний при 1643 см^{-1} (темные столбики) и линии O-H-колебаний при 3430 см^{-1} (светлые столбики), нормализованная на оптическую плотность линии C-N-колебаний при 1376 см^{-1} в Фурье-инфракрасном МНПВО спектре полиуретана от времени плазменно-ионной обработки.

и C=C; широкий континуум в области $1350\text{--}1200\text{ см}^{-1}$, отнесенный к колебаниям C-C-связей; интенсивная линия 1189 см^{-1} колебаний C-O-связей (рис. 4). Значительно большая ширина новых линий, по сравнению с линиями самого полиуретана, говорит о разупорядоченной структуре, появившейся в результате плазменно-ионной обработки.

Интенсивность вновь появившихся линий растет с увеличением времени обработки. Для примера на рис. 5 приведены оптические плотности линии 1643 см^{-1} колебаний непредельных групп C=C и линии 3430 см^{-1} колебаний гидроксильных групп, нормализованные на опти-

ческую плотность линии 1376 см^{-1} колебаний полиуретана. Аналогичные изменения интенсивности наблюдаются для остальных новых линий, появившихся после обработки.

Поверхность полиуретана после обработки становится более активной по отношению к белкам. После выдержки образцов полиуретана в растворе альбумина на поверхности полимера остается слой адсорбированного альбумина. Присутствие альбумина наблюдается по ИК-Фурье-спектрам МНПВО по присутствию характерных линий колебаний амидной группы Амид А при 3300 см^{-1} , Амид I при 1650 см^{-1} и Амид II при 1540 см^{-1} (рис. 6). Интенсивность данных линий соответствует порядку величины монослоя альбумина на поверхности. Отмывка альбумина детергентом при повышенной температуре уменьшает количество альбумина на поверхности полиуретана, но линии амидной группы остаются видны в спектре. Интенсивность линий спектра альбумина на необработанном и обработанном полиуретане различна. Для количественного измерения альбумина на поверхности полиуретана была использована оптическая плотность линии Амид I колебаний амидной группы, нормированная на линию полиуретана 1376 см^{-1} по закону Бугера–Ламберта–Бера (рис. 7). При обработке в плазме короткое время (40 с) количество адсорбированного альбумина незначительно выше, чем на необработанном полиуретане, но при обработке в течение 80 с и дольше количество альбумина заметно выше. Разница в количестве альбумина на обработанной и необработанной поверхности возрастает после отмывки ковалентно-несвязанного альбумина. Наибольшее количество ковалентно-связанного альбумина на-

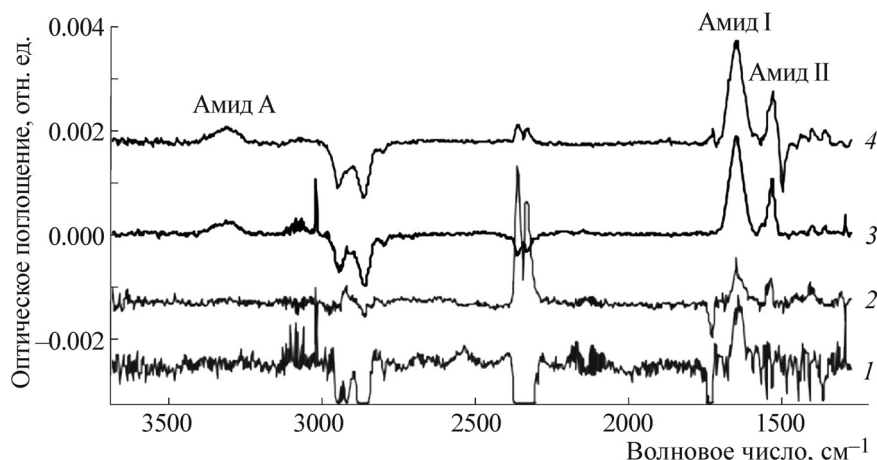


Рис. 6. ИК-Фурье-спектры МНПВО монослоя бычьего альбумина, адсорбированного на поверхности полиуретана: 1 – адсорбированный на необработанном полиуретане, 2 – адсорбированный на необработанном полиуретане и отмытый в детергенте, 3 – адсорбированный на обработанном ионами полиуретане, 4 – адсорбированный на обработанном ионами полиуретане и отмытый в детергенте. Линии белка Амид А, Амид I и Амид II отмечены на спектрах. Спектр полиуретана, обработанного таким же образом в то же самое время, но без применения белка, вытчен.

блюдается на поверхности полиуретана, обработанного в течение 800 с. При этом количество ковалентно-связанного альбумина близко к общему количеству адсорбированного альбумина на поверхности (82%).

При высевании эндотелиальных клеток на поверхность полиуретана клетки распределяются равномерно по всей поверхности необработанного образца. После двух часов на поверхности необработанного полиуретана клетки осели на поверхность полиуретана, но сохраняют компактную форму. Через двое суток после высевания часть клеток прикрепляется к поверхности необработанного полиуретана, образуя веретенообразную форму, однако часть клеток остается в компактном состоянии (рис. 8). При этом оставшиеся во взвешенном состоянии клетки удаляются при смене среды. После пяти суток наблюдается распластывание некоторой части клеток, но большая часть их остается в веретенообразном состоянии (рис. 9).

При высевании клеток на поверхность обработанного ионами полиуретана клетки распределяются так же равномерно по всей поверхности и закрепляются на поверхности. Часть из них формирует веретенообразную форму уже через 2 ч. Через двое суток большинство клеток хорошо распластаны (рис. 10). Такая же картина хорошо распластаных клеток наблюдается на поверхности контрольных ячеек. Спустя пять суток большая часть поверхности обработанного полиуретана покрыта распластанными клетками (рис. 11).

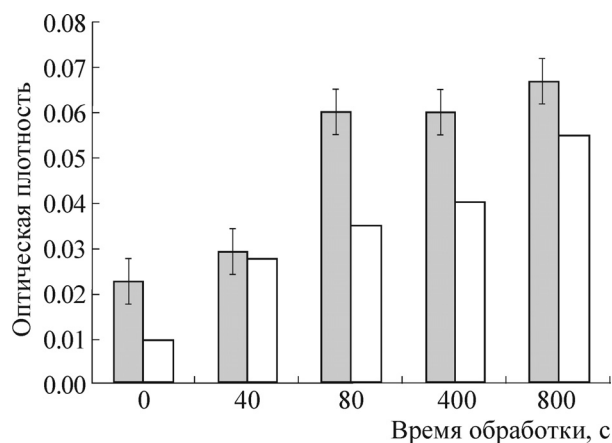


Рис. 7. Оптическая плотность линии Амид I в Фурье-инфракрасном МНПВО спектре бычьего альбумина, адсорбированного на поверхности полиуретана от времени плазменно-ионной обработки до (темные столбики) и после отмывки в детергенте (светлые столбики). Оптическая плотность линии Амид I нормирована на оптическую плотность линии полиуретана при 1367 см^{-1} .

После пяти суток плотность распределения клеток на обработанном полиуретане заметно выше, чем на необработанном (рис. 12). Однако плотность распределения клеток на обработанном полиуретане остается несколько меньше, чем на поверхности контрольного пластика для роста клеточной культуры (рис. 13). При этом распластывание клеток по полиуретану и плотность их распределения по поверхности на обработанных образцах практически не зависит от времени обработки образцов в плазме.

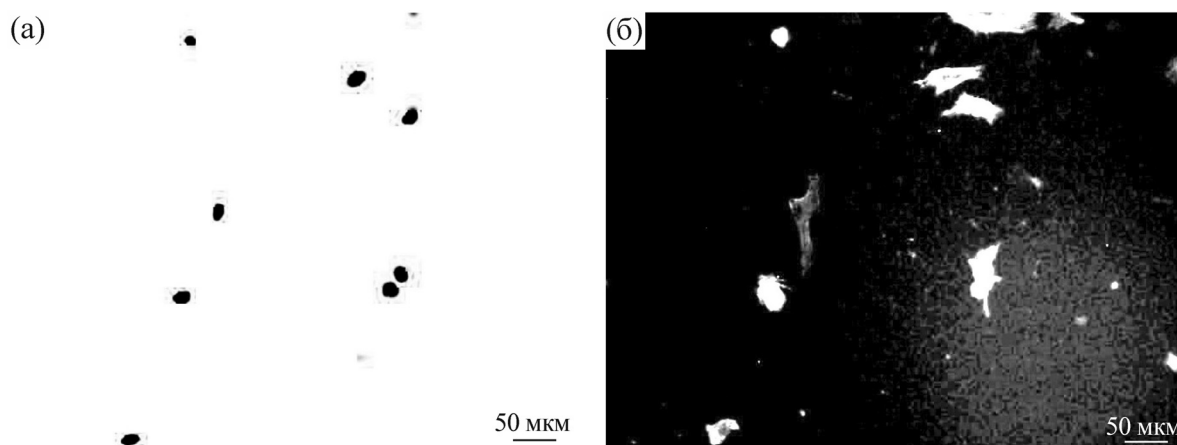


Рис. 8. Клетки на поверхности необработанного полиуретана, выросшие за двое суток после посева: (а) – ядра клеток, (б) – цитоплазма.

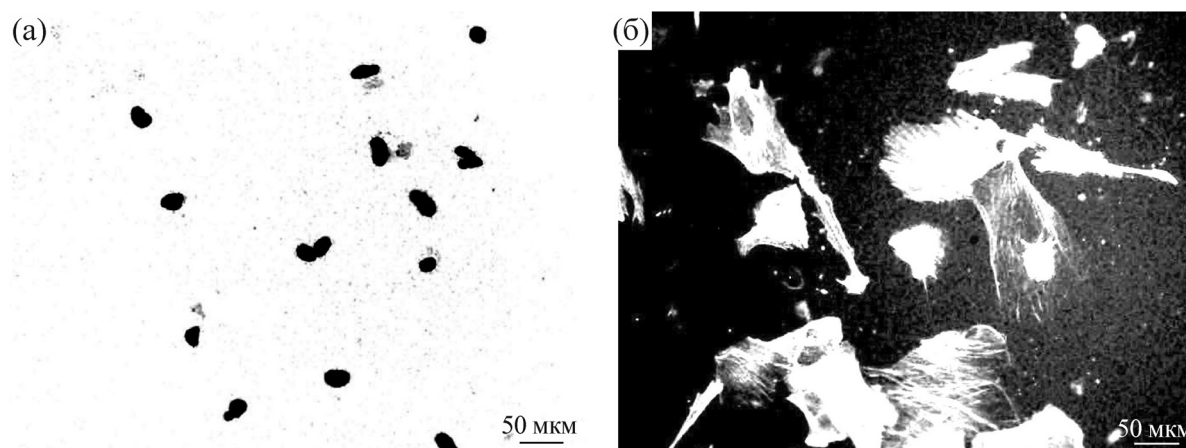


Рис. 9. Клетки на поверхности необработанного полиуретана, выросшие за пять суток после посева: (а) – ядра клеток, (б) – цитоплазма.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эффект потемнения поверхности наблюдался при обработке практически всех типов полимеров в той или иной степени, в зависимости от типа полимера [30]. Потемнение полиуретана сильнее при той же самой обработке, чем потемнение полилактогликолевой кислоты и политетрафторэтилена, однако слабее, чем у полиэтилена, полистирола и поливинилхлорида.

Причиной потемнения является карбонизация поверхностного слоя полиуретана под действием высокоэнергетических ионов и появление ароматических конденсированных структур по типу графита и графена, имеющих высокий коэффициент поглощения в ультрафиолетовой и видимой части спектра. Аналогичная карбонизация поверхности полимеров при плазменно-ионной обработке наблюдалась для полиэтилена [32], полистирола [33], поликарбона-

та [34] и других полимеров [30]. При этом происходило образование как углеродных структур, содержащих аморфную фазу углерода с атомами углерода в sp^3 -конфигурации валентных электронных оболочек, так и графитоподобной фазы с ароматическими конденсированными кластерами, где углерод находится в sp^2 -конфигурации. При этом регистрировался сигнал неспаренных электронов, соответствующих свободным радикалам [35], которые сохранялись в течение длительного времени (два года) после обработки при хранении в лабораторных условиях на воздухе при комнатной температуре [31]. Такие стабилизированные свободные радикалы наблюдаются на краях графитовых кластеров, где неспаренный электрон делокализуется на π -электронах ароматического кольца [36]. Большой размер кластера предполагает большее время делокализации и меньшую активность свободного радикала [37]. Данный ме-

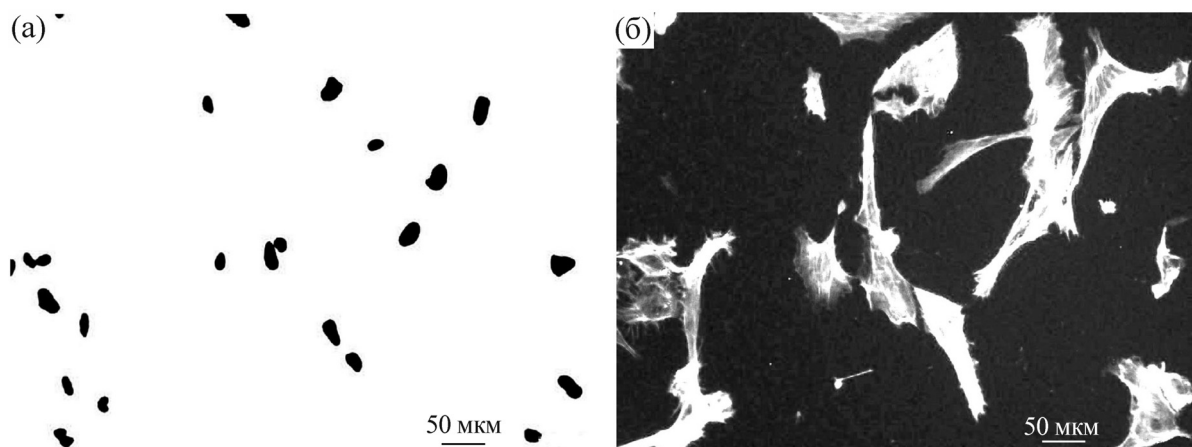


Рис. 10. Клетки на поверхности обработанного (80 с) полиуретана, выросшие за двое суток после посева: (а) – ядра клеток, (б) – цитоплазма.

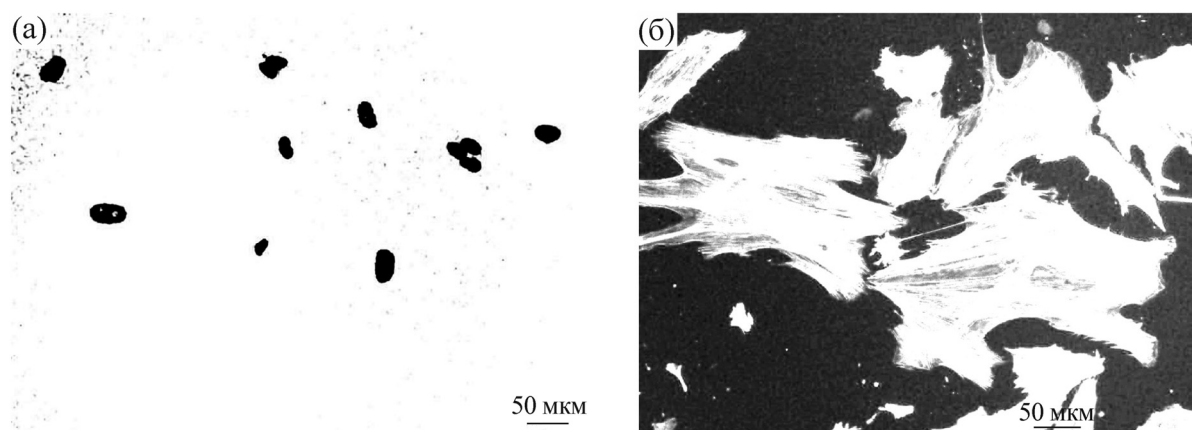


Рис. 11. Клетки на поверхности обработанного (80 с) полиуретана, выросшие за пять суток после посева: (а) – ядра клеток, (б) – цитоплазма.

ханизм стабилизации сохраняет активность свободных радикалов длительное время, даже на воздухе, при постоянном контакте с кислородом [38]. При адсорбции белка на поверхности такого кластера углерода происходит сначала адсорбция молекулы белка за счет межмолекулярных взаимодействий типа ван-дер-ваальсовых и водородных связей. Это способствует длительному времени контакта белковой молекулы с углеродным кластером, в связи с чем создаются условия для локализации неспаренного электрона на атоме углерода и возвращения активности свободного радикала. Поскольку молекула белка содержит множество групп с подвижным водородом, то реакция такой группы и свободного радикала становится очень вероятна. Эта реакция обеспечивает ковалентную связь белковой молекулы с углеродным кластером. Ряд проведенных исследований показал, что ковалентная связь наблюдается для разных белковых молекул и раз-

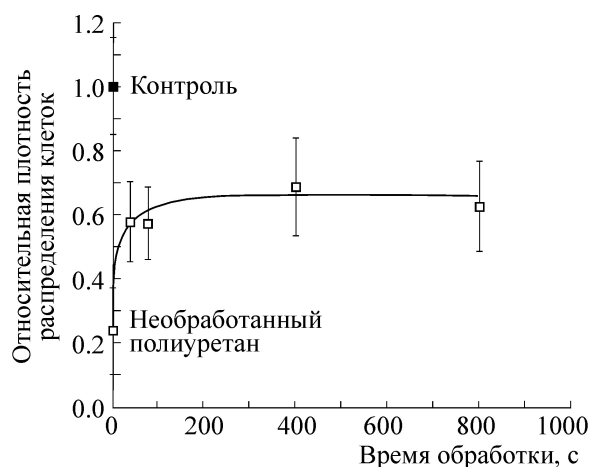


Рис. 12. Зависимость плотности распределения эндотелиальных клеток на поверхности полиуретана от времени плазменно-ионной обработки после пяти суток роста клеточной культуры на поверхности.

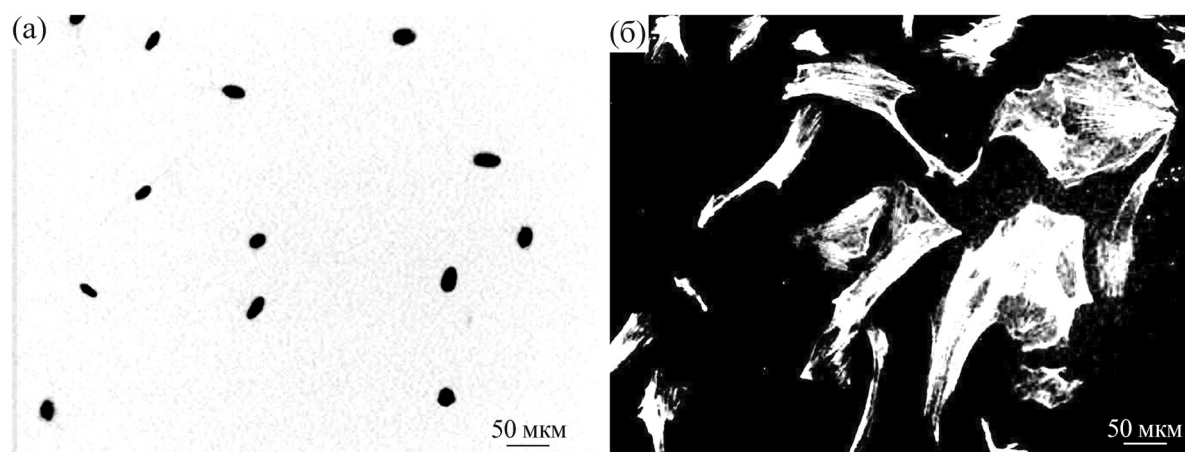


Рис. 13. Клетки на поверхности контрольного пластика для клеточных культур, выросшие за пять суток после посева: (а) – ядра клеток, (б) – цитоплазма.

ных типов полимеров [31]. Высокая химическая активности свободных радикалов показала универсальный характер образования ковалентной связи со всеми аминокислотами [39]. Такая же активность полиуретана наблюдается после обработки и обеспечивает ковалентную связь альбумина на его поверхности. Таким образом, ковалентно-связанный белок не может быть смыт жидкостями в организме, и клетки всегда будут взаимодействовать с адсорбированным белком, а не с полиуретаном.

Формирование и активность свободных радикалов на поверхности полимеров наблюдалась по изменению поверхностной энергии и ее компонент [38–40], когда присутствие неспаренных электронов на свободных радикалах дает экстремально высокую поверхностную энергию обработанной поверхности полимеров, которая не может быть объяснена только присутствием кислородсодержащих групп (до 70–80 МДж/м²) [39]. В случае полиуретана поверхностная энергия после двух недель хранения на воздухе составляет 53 мДж/м², что соответствует поверхностной энергии других полимеров после обработки и длительного хранения на воздухе [41].

ИК-Фурье-спектры МНПВО показали высокую концентрацию гидроксильных групп в поверхностном слое обработанного полиуретана по сравнению с другими обработанными плазмой полиэтиленом и полистиролом [33,42]. Такая же высокая концентрация гидроксильных групп наблюдалась в обработанных полиэфирах [43], где процессы деполимеризации вызывались миграцией свободных радикалов в глубокие слои полимера. Эфирная связь в результате такой реакции разрывается, и образуется гидроксильная группа. Значительная интенсив-

ность линий гидроксильных групп объясняется большей глубиной инфракрасного аналитического луча в спектроскопии МНПВО (около 1 мкм), чем толщина проникновения ионов в полиуретан (около 70 нм, согласно расчетам с использованием программы TRIM [44,45]). Таким образом, верхний слой полиуретана (70 нм) карбонизируется под действием ионов, тогда как более глубокие слои полиуретана (более 70 нм) частично деполимеризуются. Аналогичная слоистая структура наблюдалась при обработке полиметилметакрилата и поликарбоната [34,43].

Способность поверхности обработанного полиуретана служить основой для формирования белкового слоя, который обеспечивает возможность прикрепления к нему эндотелиальных клеток. Клетки адсорбировались на поверхности обработанного полиуретана за короткое время. Факт их расплывания и активное деление показали, что белки мембран клеток обеспечили их прикрепление и биологическую функциональность на поверхности модифицированного полиуретана. В случае необработанного полиуретана клетки хуже прикреплялись, неактивно расплывались, что может быть объяснено изменением функциональности белков стенок клеток, отвечающих за прикрепление, в том числе из-за более гидрофобной поверхности необработанного полиуретана.

Сохранению функциональности белка, адсорбированного на поверхности модифицированного полиуретана, способствовала высокая гидрофильность поверхности обработанного полиуретана. Это обстоятельство обеспечивает для белковой молекулы сохранение гидрофильных групп на внешней стороне, аналогично тому, как это происходит в естественном гидрофильном окружении в водном растворе.

Клетки пролиферировали на поверхности обработанного полиуретана в течение пяти суток, что показало отсутствие токсичности самого полиуретана и его карбонизованного слоя для клеточной культуры. Стабильная адсорбция и пролиферация клеток на обработанном полиуретане является одним из важных условий успешного использования полиуретана в качестве материала для имплантатов мягких тканей.

ВЫВОДЫ

Проведенные исследования показали, что полиуретан, модифицированный плазменно-ионной обработкой, содержит слоистую структуру, состоящую из карбонизованного слоя толщиной около 70 нм и частично деполимеризованного слоя, расположенного ниже карбонизованного слоя. Активность поверхности полиуретана обеспечивается за счет высокой универсальной активности свободных радикалов. Высокая активность обеспечивает стабильную адсорбцию белка на поверхности полиуретана с образованием ковалентной связи. Повышенная гидрофильность поверхности модифицированного полиуретана обеспечивает сохранение биологической активности адсорбированного белка. Это способствует адсорбции и пролиферации эндотелиальных клеток на поверхности полиуретана, что важно для использования модифицированного полиуретана, как материала для имплантатов мягких тканей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №16-48-590767_p_Урал_a) и субсидии (гранта) Пермского края (соглашение № С-26/057 от 11 марта 2016 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Биосовместимость*, под ред. В. И. Севастьянова и М. П. Кирпичникова (Медицинское информационное агентство, М., 1999).
2. M. D. Lelah and S. L. Cooper, *Polyurethanes in medicine* (CRC Press, 1986).
3. R. S. Ward and R. L. Jones, in *Comprehensive biomaterials*, Ed. by P. Ducheyne (Elsevier, Oxford, 2011), pp. 431–477.
4. P. Klement, Y. J. Du, L. R. Berry, et al., *Biomaterials* **27**, 5107 (2006).
5. J. H. de Groot, R. de Vrijer, A. J. Pennings, et al., *Biomaterials* **17**, 163 (1996).
6. Т. Э. Липатова и Г. А. Пхакадзе, *Полимеры в эндопротезировании* (Наук. думка, Киев, 1983).
7. Н. А. Платэ и А. Е. Васильев, *Хим. фарм. журн.*, № 7, 16 (1980).
8. N. R. James, J. Philip, and A. Jayakrishnan, *Biomaterials* **27**, 160 (2006).
9. Z. Ma, Y. Hong, D. M. Nelson, et al., *Biomacromolecules* **12**, 3265 (2011).
10. M. J. N. Pereira, B. Ouyang, C. A. Sundback, et al., *Adv. Mater.* **25**, 1209 (2013).
11. G. T. Howard, *Int. Biodeterioration & Biodegradation* **49**, 245 (2002).
12. D. J. Wheatley, L. Raco, G. M. Bernacca, et al., *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.* **17**, 440 (2000).
13. Y. Hong, S.-H. Ye, A. Nieponice, et al., *Biomaterials* **30**, 2457 (2009).
14. V. Kanyanta and A. Ivankovic, *J. Mechan. Behaviour Biomed. Materials* **3**, 51 (2010).
15. R. Barnbauer, P. Mestres, R. Schiel, et al., *Artif. Organs* **21** (9), 1039 (1997).
16. J. E. Graya, P. R. Nortona, R. Alnounoa, et al., *Biomaterials* **24**, 2759 (2003).
17. I. V. Osorgina, V. P. Begishev, A. V. Kondyurin, and S. A. Plaksin, *Plasticheskie massi*, № 8, 26 (1997).
18. Y. Suzuki, M. Kusakabe, J.-S. Lee, et al., *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. Section B* **65**, 142 (1992).
19. L. Dejun, Z. Jie, G. Hanqing, et al., *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. Section B* **82**, 57 (1993).
20. M. Iwaki, A. Nakao, M. Kaibara, et al., *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. Section B* **106**, 618 (1995).
21. Y. Suzuki, *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. Section B* **206**, 501 (2003).
22. K. H. Wong, M. Zinke-Allmang, W. K. Wan, et al., *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. Section B* **243**, 63 (2006).
23. J.-S. Lee, M. Kaibara, M. Iwaki, et al., *Biomaterials* **14** (12), 958 (1993).
24. B. Pignataro, E. Conte, A. Scandurra, and G. Marletta, **8**, 1461 (1997).
25. N. Ozkucur, E. Richter, C. Wetzel, et al., *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **93**, 258 (2009).
26. P. K. Chu, J. Y. Chen, L. P. Wang, and N. Huang, *Mater. Sci. Engineer.* **R36**, 143 (2002).
27. V. Begishev, N. Gavrilov, G. Mesyats, in *Proc. 12th Intern. Conf. on High-Power Particle Beams*, Ed. by M. Markovits and J. Shiloh (Haifa, Israel, 1998), Vol. 2, pp. 997–1000.
28. A. Kondyurin and M. F. Maitz, *Surface Modification of ePTFE and Implants using the same*, US patent WO 2007/022174 A3, 2007.
29. M. Bilek, D. McKenzie, N. Nosworthy, and A. Kondyurin, *Activated polymers binding biological molecules*, WO 2007104107 (A1), Australian Patent Application Number 2007225021 (PCT/AU2007/000321), 2009.
30. A. Kondyurin and M. Bilek, *Ion Beam Treatment of Polymers. Application aspects from medicine to space* (Elsevier, Oxford, 2008).
31. M. M. M. Bilek, D. V. Bax, A. Kondyurin, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** (35), 14405 (2011).
32. G. A. Mesyats, Yu. S. Klyachkin, N. V. Garilov, et al., *Vacuum* **47** (9), 1085 (1996).
33. E. Kosobrodova, A. Kondyurin, D. R. McKenzie, and M. M. M. Bilek, *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. Section B* **304**, 57 (2013).

34. E. Kosobrodova, A. Kondyurin, W. Chrzanowski, et al., Nucl. Instr. Methods Phys. Res. Section B **329** 52 (2014).
35. E. A. Kosobrodova, A. V. Kondyurin, K. Fisher, et al., Nucl. Instr. Methods Phys. Res. Section B **280**, 26 (2012).
36. D. C. Nonhebel and J. C. Walton, *Free radical chemistry; Structure and Mechanism* (CUP Archive, 1974).
37. S. E. Stein and R. L. Brown, Carbon **23** (1), 105 (1985).
38. Н. В. Гаврилов, В. Н. Мизгулин, Р. Стиннетт и А. В. Кондюрин, Хим. физика и мезоскопия **1** (1), 39 (1999).
39. A. V. Kondyurin, P. Naseri, J. M. R. Tilley, et al., Scientifica, Article ID 126170 (2012). DOI: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/126170>.
40. M. Kuzuya, H. Ito, S. Kondo, et al., Macromolecules **24**, 6612 (1991).
41. A. Kondyurin, N. J. Nosworthy, M. M. M. Bilek, et al., J. Appl. Polymer Sci. **120**, 2891 (2011).
42. G. Mesyats, Yu. Klyachkin, N. Gavrilov, and A. Kondyurin, Vacuum **52**, 285 (1999).
43. A. Kondyurin and M. Bilek, Nucl. Instr. Methods Phys. Res. Section B **269**, 1361 (2011).
44. J. F. Ziegler and J. P. Biersack, in *The Stopping and Range of Ions in Solid* (Pergamon, New York, 1985), p. 321.
45. В. Б. Оджаев, И. П. Козлов, В. Н. Попок и Д. Б. Свиридов, *Ионная имплантация полимеров* (Белорусский государственный университет, Минск, 1998).

Polyurethane Modified by Plasma Ion Implantation for Medical Application

V.S. Chudinov*, **I.V. Kondyurina****, **I.N. Shardakov***, **A.L. Svistkov***,
I.V. Osorgina***, and **A.V. Kondyurin******

**Institute of Continuous Media Mechanics, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Akademika Koroleva 1, Perm, 614013 Russia*

***School of Medicine, University of Sydney, Sydney, Australia*

****Perm State University, ul. Bukireva 15, Perm, 614990 Russia*

*****School of Physics, University of Sydney, Sydney, Australia*

Medical polyurethane was treated by 20 keV nitrogen ions with fluence of 10^{14} – 10^{16} ions/cm². Modified polyurethane has a layer structure consisting of carbonised layer of 70 nm thickness and partly depolymerized layer below the carbonised layer. High activity of polyurethane due to free radicals provides stability of covalently attached protein molecules to the surface layer of polyurethane. High hydrophilicity of modified polyurethane surface retains biological activity of the attached proteins. It contributes to attachment and proliferation of endothelial cells on the polyurethane surface. Thus, modified polyurethane can be used as the material for soft tissue medical implants.

Keywords: biocompatibility, implant, polyurethane, plasma ion implantation, carbonised layer