

## Химическая пришивка альбумина на поверхность полиуретанового имплантата, модифицированного ионным пучком

### Аннотация

Синтезирован полиуретан с низким модулем упругости для имплантации мягких тканей. Полиуретан обработан ионами азота с энергией 20 кэВ, что создало на поверхности графитоподобный слой толщиной около 56 нм с активными свободными радикалами на краях графитовых плоскостей. Получено ковалентное связывание монослоя альбумина на поверхности обработанного полиуретана путем свободно-радикальных реакций.

### Введение

Внедрение искусственного кардиоимплантата вызывает в организме реакции иммунной системы и стромы органов и тканей в виде комплекса местных клеточно-иммунных реакций и реакций коммуникационных систем на инородное тело [1], [2]. Результатами этих реакций являются формирование соединительнотканной капсулы, изолирующей имплантат, нарушение функций органа, развитие контрактур, воспалительных осложнений и ряд других неблагоприятных исходов операций. Во всех 100 % случаев использования имплантатов реакция организма происходит как воспалительная продуктивная реакция на инородное тело. Значительная часть имплантатов отторгается, что требует повторных оперативных вмешательств. Среди послеоперационных осложнений большую опасность представляют тромбозы сосудов, клапанов и тромбозомболический синдром. Велики риски операции, особенно для пациентов в пожилом возрасте и при наличии тяжелой патологии сосудов, обусловленной сахарным диабетом и другими заболеваниями. Иммунодепрессанты как средство уменьшения реакции иммунной системы организма не всегда применимы вследствие побочных эффектов, особенно в случаях комплексных заболеваний. В связи с вышеизложенным, создание имплантатов с отсутствием или минимальной реакцией окружающих тканей на инородное тело является в последние годы одной из приоритетных задач. Возможность и перспективность таких имплантатов показаны в ряде современных исследований по созданию сплошного активного белкового прочно-сшитого слоя на поверхности имплантата, исключающего прямой контакт клеток иммунной системы организма с самой поверхностью имплантата [3]-[5]. Создание такого белкового слоя обеспечивается наличием углеродного слоя с активными свободными радикалами, стабилизированными р-электронами на поверхности имплантата.

Полимерные имплантаты являются наиболее перспективными видами искусственных имплантатов, замещающих органы и мягкие ткани организма. Основные исследования в прошлые годы были направлены на обеспечение нетоксичности материалов, их неканцерогенности, стабильности материалов в организме в течение многих лет с сохранением функциональности имплантата и других его свойств. Практически все современные имплантаты последнего поколения соответствуют данным требованиям. Однако требование отсутствия иммунного ответа на внедрение имплантата для современных имплантатов не рассматривается.

Другим важным требованием для имплантатов мягких тканей является совместимость биомеханических свойств имплантата и живой окружающей ткани. Сертифицированные к применению полимерные материалы не обеспечивают совместимости биомеханических свойств. Так, например, модуль Юнга перспективных полиуретанов медицинского назначения составляет от 4 до 80 МПа [6], [7], а сертифицированный полиуретан марки «Пеллетан» фирмы «Доу Кемикл» (США) составляет до сотни мегапаскалей в зависимости от марки полиуретана, тогда как модуль Юнга мягких тканей организма варьируется от единиц до сотен килопаскалей [8]-[11].

В рассматриваемой работе предпринята попытка создать полиуретан с уменьшенным модулем Юнга на основе компонентов, применяемых для сертифицированных полиуретанов. Таким образом, новый полиуретан может быть сертифицирован с меньшими затратами и в то же время обладать большей биомеханической совместимостью с тканями организма. Для создания активного углеродного слоя использовалась обработка поверхности полиуретанового имплантата ионами высокой энергии.

### Материалы и методы

Полиуретан синтезировался из форполимера на основе полипропиленгликоля с концевыми гидроксильными группами, терминированными 2,4-толуилен диизоцианатом. После завершения реакции полиуретан отжигался в вакуумном термошкафу при температуре 120 °С. Затем полиуретан отмывался в гептане и деионизованной воде и сушился в защищенном от пыли месте. Полученный полиуретан исследовался методами ИК-спектроскопии на присутствие изоцианатных групп, методами механического разрушения – на эластичные и прочностные свойства, набуханием в трибутилфосфате и формамиде – на формирование трехмерной сшивки, выдержкой в водном растворе – на присутствие и выделение непрореагировавших форполимеров, на гидролизную стабильность в водных растворах при повышенной температуре, на токсичность – методами клеточных культур и имплантацией в животных (мыши).

Полиуретан обрабатывался пучком ионов азота с энергией 20 кэВ в вакуумном реакторе при давлении 0,27 Па. Обработка в реакторе в течение 800 с соответствовала флюенсу  $10^{16}$  ион/см<sup>2</sup>.

После обработки образцы полиуретана погружались в раствор альбумина из сыворотки крови (производитель – фирма «Сигма-Элдридж», США) в PBS-буфере (концентрация буфера 10 ммоль, pH 7) при концентрации 20 мкг/мл и выдерживался там 24 ч. После этого образцы отмывались в буферном растворе 3 раза и в деионизованной воде. После отмывки образцы сушились в течение 24 ч. Для удаления альбумина, физически адсорбированного на поверхности полиуретана, использовался детергент додецилсульфат натрия (SDS). Для этого образцы полиуретана отмывались в 2%-ном растворе SDS при температуре 70 °С в течение 1 ч. После этого образцы отмывались 3 раза в деионизованной воде и сушились 24 ч.

Спектры КРС возбуждались линией лазера 514 нм и регистрировались на спектрометре («Рэнишау», Великобритания) с микроскопом. Толщина и оптические параметры модифицированного поверхностного слоя полиуретана измерялись с помощью спектрального эллисометра M2000V («Вуулам», США). Топография поверхности полиуретана после обработки анализировалась с помощью атомно-силового микроскопа («Парк Систем», Южная Корея). Рентгеновские фотоэлектронные спектры (РФЭС) регистрировались на спектрометре «СПЕКС» (Германия). Спектры ИК МНПВО регистрировались на Фурье-спектрометре («Диджилаб», США) с приставкой МНПВО («Харрик», США) с кристаллом германия (трапеция).

## Результаты

Спектры КРС полиуретана содержат линии, относящиеся к колебаниям макромолекулы полиуретана. Наиболее интенсивные пики наблюдаются в области  $1619\text{ см}^{-1}$  (колебания ароматического кольца),  $1453$  и  $1320\text{ см}^{-1}$  (колебания эфирной части макромолекулы), а также менее интенсивные пики  $1712$  и  $1540\text{ см}^{-1}$  (колебания Амид I и II уретановой группы),  $1080$ ,  $1125$  и  $1267\text{ см}^{-1}$  (скелетные колебания полиэфирной цепи).

Спектр КРС полиуретана, обработанного с флюенсом  $10^{16}$  ион/см<sup>2</sup>, показал также линии полиуретана ( $1128$ ,  $1250$ ,  $1450$ ,  $1524$  и  $1690\text{ см}^{-1}$ ), но интенсивность этих линий намного меньше, чем в спектре необработанного полиуретана. Наблюдаются также две новые интенсивные линии  $1348$  и  $1595\text{ см}^{-1}$ , относящиеся к колебаниям углеродных структур. Пик при  $1595\text{ см}^{-1}$  относится к колебаниям  $E_{2g}$  графита. Тип данного колебания активен в спектре КРС. Пик при  $1348\text{ см}^{-1}$  относится к колебаниям  $A_{1g}$  графита. Данный пик не активен в спектрах КРС. Появление данного пика связано с присутствием дефектов графитовой структуры и нарушением правил отбора спектра КРС. Интенсивность и положение пиков показывают, что данные линии относятся к резонансному эффекту КРС спектров, когда линия поглощения электронных уровней графитовых структур совпадает или близка к линии возбуждения лазера ( $514\text{ нм}$ ) в КРС-спектрах. Согласно модели правил углеродных структур Феррари и Робертсона [12], [13], положение линий и соотношение интенсивностей соответствуют а-С структуре аморфного углерода с графитовыми кластерами характерного размера около  $2\text{ нм}$ . Таким образом, спектры КРС показывают, что на поверхности полиуретана в результате ионной обработки создан графитоподобный слой.

Для анализа толщины модифицированного слоя использовался метод эллипсометрии. Функция Коши использовалась для построения модели оптических параметров необработанного полиуретана. Показатель преломления лежит в области  $1,5$  и показывает слабую дисперсию. Такое же возрастание в коротковолновой области спектра показывает и коэффициент экстинкции. Для обработанного полиуретана использовалась двухслойная модель с необработанным полиуретаном и с тонким слоем на поверхности полиуретана. Показатель преломления поверхностного слоя лежит в области  $1,7...1,8$  и показывает сильную дисперсию в коротковолновой области спектра. Одновременно с этим коэффициент экстинкции показывает поглощение в области коротких волн. Эти результаты соответствуют данным, полученным для других полимерных материалов, модифицированных ионной обработкой [14]. Показатель преломления поверхностного слоя модифицированного полиуретана близок к показателю преломления углеродных материалов. Однако он не достигает значений показателя преломления алмаза ( $2,4$ ) или графита ( $1,93...2,07$ ). Аналогично, коэффициент экстинкции не показывает высоких значений, характерных для графитовых материалов. При этом толщина модифицированного слоя составила  $56\text{ нм}$ .

Топология поверхности полиуретана тоже значительно меняется под действием обработки. Поверхность необработанного полиуретана неровная, но показывает однородность взаимодействия с кантиливером микроскопа по фазовому изображению. Характер неровности поверхности случайный.

Поверхность обработанного полиуретана характеризуется большим числом складок и трещин. Анализ складок показывает, что амплитуда складок намного превышает толщину модифицированного слоя и неоднородности исходной поверхности полиуретана. Направление складок хаотичное, не связанное с направлением трещин или размерами образца.

РФЭС-спектры показали также изменение структуры поверхностного слоя. Спектр РФЭС необработанного полиуретана содержит линии кислорода O1s, азота N1s и углерода C1s в соответствии с химической формулой полиуретана. Спектр кислорода содержит дублет линий, соответствующих кислороду в простой эфирной связи гликолевого участка макромолекулы и кислороду в уретановой группе. В спектре полиуре-

тана после обработки относительная интенсивность линии кислорода уменьшается и соотношение пиков кислорода с одинарными и двойными связями выравнивается. Линия азота в спектре необработанного полиуретана показывает синглетный пик, соответствующий уретановой группе. В спектре полиуретана после обработки линия азота имеет несколько компонентов, соответствующих азоту в различных связях с углеродом и кислородом. Линия углерода показывает присутствие углеродного атома в углеводородном участке макромолекулы, в уретановой группе и простой эфирной группе, причем вклад последней превалирует по интенсивности. В спектре полиуретана после обработки наблюдается основной пик углерода, соответствующий графитным структурам. Вклад других групп углерода, таких как простого эфирного и при двойной связи с кислородом или азотом, значительно уменьшен. При этом общая относительная интенсивность углерода в спектре обработанного полиуретана выше, чем в спектре необработанного полиуретана.

Таким образом, результатом ионной обработки является карбонизованный жесткий слой толщиной не менее  $56\text{ нм}$ , подверженный окислению и азотированию, формирующий трещины и складки поверхностного слоя. Данный слой аналогичен карбонизованному слою, получаемому при обработке других полимеров, таких как полиэтилен, полистирол, тефлон и т. п. [15]. При этом в ряде работ было показано, что такой карбонизованный слой способствует пришиванию белкового слоя по реакции со свободными радикалами, стабилизированными  $\pi$ -электронами графитовых кластеров [4], [5], [16].

Для проверки активности такого слоя на поверхность полиуретана наносился слой бычьего альбумина в водном растворе. После удаления не адсорбированного на поверхности альбумина регистрировался спектр поверхности полиуретана. Спектры полиуретана вычтены для лучшего наблюдения спектра альбумина. В спектре обработанного и необработанного полиуретана наблюдаются линии Амид A, I и II, соответствующие колебаниям амидной группы альбумина.

Для анализа ковалентной пришивки альбумин, не связанный ковалентно с полиуретаном, отмывался в детергенте. В спектре необработанного полиуретана линии альбумина не проявляются. В спектрах обработанного полиуретана линии альбумина хорошо видны при почти полном сохранении относительной интенсивности линий альбумина по сравнению со спектрами не отмываемых в детергенте образцов. Таким образом, обработка полиуретана обеспечивает пришивку белка к поверхности за счет химической связи.

## Выводы

Обработка высокоэнергетическими ионами создает на поверхности полиуретанового имплантата карбонизованный слой, состоящий из аморфного углерода с включениями графитовых кластеров. Данный слой способен химически адсорбировать белковые молекулы за счет ковалентной связи, образуемой в результате реакции белковой молекулы с свободными радикалами на краях графитовых кластеров, обеспечивая несмываемую белковую пленку на поверхности полиуретана. Данный имплантат может быть перспективен для дальнейших исследований с клеточными культурами и для имплантации в животных для проверки отклика иммунной системы на внедрение такого имплантата.

*Данные исследования были поддержаны грантами РФФИ № 16-48-590767\_p\_Урал а и субсидии (гранта) Пермского края (соглашение № C-26/057 от 11 марта 2016 г.).*

### Список литературы:

1. Kannan R. Y., Salacinski H. J., Butler P. E., Hamilton G., Seifalian A. M. Current status of prosthetic bypass grafts: A review // Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials. 2005. Vol. 74. PP. 570-581.
2. Ballyk P. D., Walsh C., Butany J., Ojha M. Compliance mismatch may promote graft-artery intimal hyperplasia by

- altering suture-line stresses // Journal of Biomechanics. 1998. Vol. 31. PP. 229-237.
3. *Begishev V., Gavrilov N., Mesyats G., Klyachkin Yu., Kondyurina I., Kondyurin A., Osorgina I.* Modification of polyurethane endoprosthetics surface by pulse ion beam / Proc. of 12th Intern. Conf. on High-Power Particle Beams, Haifa, Israel, June 7-12, 1998. Ed. by M. Markovits and J. Shiloh. Vol. 2. PP. 997-1000.
  4. *Kondyurin A., Maitz M.F.* Surface Modification of ePTFE and Implants using the same / US patent WO 2007/022174 A3, 2007.
  5. *Kondyurina I., Shardakov I., Nechitailo G., Terpugov V., Kondyurin A.* Cell growing on ion implanted polytetrafluorethylene // Applied Surface Science. 2014. Vol. 314. PP. 670-678.
  6. *Kanyanta V., Ivankovic A.* Mechanical characterization of polyurethane elastomer for biomedical applications // Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. 2010. Vol. 3. PP. 51-62.
  7. *Gorna K., Gogolewski S.* Molecular stability, mechanical properties, surface characteristics and sterility of biodegradable polyurethanes treated with low-temperature plasma // Polymer Degradation and Stability. 2003. Vol. 79. PP. 475-485.
  8. *Akhtar R., Sherratt M.J., Cruickshank J.K., Derby B.* Characterizing the elastic properties of tissues // Materials Today. 2011. Vol. 14. № 3. PP. 96-105.
  9. *Ahn B., Kim J.* Measurement and characterization of soft tissue behavior with surface deformation and force response under large deformations // Medical Image Analysis. 2010. Vol. 14. PP. 138-148.
  10. *Bergstrom J.S., Boyce M.C.* Constitutive modelling of the time-dependent and cyclic loading of elastomers and application to soft biological tissues // Mechanics of Materials. 2001. Vol. 33. PP. 523-530.
  11. *Wells S.M., Walter E.J.* Changes in the Mechanical Properties and Residual Strain of Elastic tissue in the developing Fetal Aorta // Annals of Biomechanical Engineering. 2010. Vol. 38 (2). PP. 345-356.
  12. *Ferrari A.C., Robertson J.* Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon // Phys. Rev. 2000. Vol. B 61. PP. 14095-14107.
  13. *Ferrari A.C., Basko D.M.* Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene // Nature Nanotechnology. 2013. Vol. 8. PP. 235-246.
  14. *Hong W., Woo H.-J., Choi H.-W., Kim Y.-S., Kim G.-d.* Optical property modification of PMMA by ion-beam implantation // Applied Surface Science. 2001. Vol. 169-170. PP. 428-432.
  15. *Гаврилов Н.В., Мизгулин В.Н., Стиннетт Р., Кондюрин А.В.* Модификация полимерных пленок ПЭ, ПТФЭ, ПК, ПИ импульсными ионными пучками // Химическая физика и мезоскопия. 1999. Т. 1. № 1. С. 39-47.
  16. *Кондюрина И.В., Нечитайло Г.С., Кондюрин А.В.* Ионно-лучевая модификация политетрафторэтилена и адгезия клеток // Пластические массы. 2011. № 1. С. 15-21.

Ирина Викторовна Кондюрина,  
аспирант,  
Сиднейская школа медицины,  
Университет Сиднея,  
г. Сидней, Австралия,  
Вячеслав Сергеевич Чудинов,  
аспирант,  
Институт механики сплошных сред  
Уральского отделения РАН –  
филиал ФГБУН «Пермский федеральный  
исследовательский центр Уральского  
отделения РАН» (ИМСС УРО РАН),  
Виктор Николаевич Терпугов,  
канд. техн. наук, доцент,  
кафедра механики сплошных сред  
и вычислительных технологий,  
ФГБУН ВО «Пермский государственный  
национальный исследовательский университет»,  
г. Пермь,  
Алексей Викторович Кондюрин,  
канд. техн. наук, сеньор исследователь,  
Сиднейская школа физики,  
Университет Сиднея,  
г. Сидней, Австралия,  
e-mail: terpugov@psu.ru

**ВНИМАНИЮ ПОДПИСЧИКОВ,  
РУКОВОДИТЕЛЕЙ СЛУЖБ ИНФОРМАЦИИ И БИБЛИОТЕК!**

**ПРЕДЛАГАЕМ ПОДПИСАТЬСЯ НА ЖУРНАЛ  
«МЕДИЦИНСКАЯ ТЕХНИКА»**

**НА 2018 ГОД.**

**Индекс по каталогу «Роспечать» – 72940.**

**Индекс по каталогу «Пресса России» – 38861.**

**В редакции можно оформить и оплатить льготную подписку с любого месяца.**

**Стоимость подписки : 1200 руб. – за один номер,**

**3600 руб. – на первое полугодие 2018 года (3 номера), 7200 руб. – на 2018 год (6 номеров).**

**Наши тел.: (495) 695-10-70, 695-10-71.**