

Сравнительное исследование влияния некоторых методов модификации поверхности пленок полиэтилена на взаимодействие с компонентами крови

**В. И. Севастьянов, Е. А. Немец, В. П. Столяров,
В. А. Баранов, Н. Н. Божко, В. Г. Назаров**

Проведены сравнительные исследования влияния поверхностной модификации пленок полиэтилена методами плазмохимической обработки и химической модификации фторированием и сульфированием на взаимодействие с компонентами крови. Для варьирования глубины и интенсивности воздействия этих методов на поверхность полиэтилена выбирали различное время обработки при оптимальных значениях других параметров процессов модификации. Определены наблюдаемые при этом изменения некоторых характеристик поверхности полиэтилена, таких, как краевой угол смачивания по воде, поверхностная энергия, морфология поверхностного слоя. Показано, что эти изменения носят симбатный характер. Изучено влияние методов обработки полиэтилена на параметры гемосовместимости модифицированной поверхности: степень гемолиза, индуцированной контактом с чужеродной поверхностью, количество адгезированных тромбоцитов и степень их активации. Все три изученных метода модификации продемонстрировали возможность значительного улучшения параметров гемосовместимости, однако наиболее перспективным является метод поверхностного фторирования, обеспечивающий максимальное повышение гемосовместимых свойств и позволяющий модифицировать готовые изделия различной формы и размеров.

Ключевые слова: полиэтилен, модификация поверхности, плазмохимическая обработка, фторирование, сульфирование, гемосовместимость, адгезия и активация тромбоцитов.

We performed a comparative study of the effect of surface modification of polyethylene film by methods of plasma-chemical processing and chemical modification by fluorination and sulfonation to the interaction with components of blood. For varying the depth and intensity of the impact of these methods on the surface of polyethylene we have chosen different processing time for optimum values of other parameters of modification processes. We have identified observed changes in some characteristics of the surface of polyethylene, such as the contact angle of water, surface energy, morphology of the surface layer. It was shown that these changes are of symbate character. We have investigated the effect of processing parameters on the blood compatibility of polyethylene modified surface: the degree of hemolysis induced by exposure to a foreign surface, the number of adhered platelets and the degree of their activation. All three investigated modifications of the method have demonstrated the significant improvement in parameters of the blood compatibility, with the method of surface fluorination being the most promising. It provides the maximum increase of the hemocompatible properties and allows to modify the finished products of various shapes and sizes.

Key words: polyethylene, surface modification, plasma-chemical treatment, fluorination, sulfonation, blood compatibility, platelets adhesion and activation.

Введение

К настоящему времени разработан ряд полимерных и композиционных материалов для искусственных органов и изделий медицинского назначения с комплексом позитивных физико-

химических и биологических свойств. Однако ни один материал в полной мере не удовлетворяет предъявляемым требованиям по совместимости с тканями и кровью человека [1, 2]. Основные усилия в этой области направлены на разработку способов модифицирования медицинских изделий с использова-

нием широкого ряда физических, химических и физико-химических методов. Показано [3], что гемосовместимые материалы при контакте с кровью должны иметь минимальное значение межфазной свободной энергии и одинаковый характер распределения полярных и дисперсионных компонентов свободной энергии поверхности материала и крови.

Известно, что в процессе контакта чужеродного материала с кровью на его поверхности формируется слой белка плазмы крови, динамика изменения состава и структуры которого и определяют во многом физико-химические и биосовместимые свойства изделия. Предполагается, что гемосовместимые материалы при контакте с кровью должны иметь минимальное значение межфазной свободной энергии и одинаковый характер распределения полярных и дисперсионных компонентов свободной энергии поверхности материала и крови (белков плазмы), соответственно (“гипотеза комплементарности”) [4]. При выполнении этих условий поверхность адсорбирует минимальное количество белка, легко обменивающегося с белками плазмы крови, что приводит в конечном итоге к повышению гемосовместимости материала. Биологические структуры, в частности — мембраны клеток, включают в себя гидрофильные и гидрофобные домены размером от 10 – 50 нм до долей ангстрема. Предполагается, что моделирование подобного рода структуры на поверхности синтетических материалов позволит с большей вероятностью добиться необходимых с точки зрения “гипотезы комплементарности” энергетических параметров поверхности и увеличить био- и гемосовместимость изделий [5]. Для создания мозаичных структур на поверхности биоматериалов используют ряд физико-химических методов, например, иммобилизацию функциональных химических групп (–ОН, –COOH, –NH₂, –F) на активные центры, образующиеся после обработки материала вакуумным ультрафиолетом [6, 7], плазменным разрядом [8 – 11]. Общими недостатками большинства из предложенных к настоящему времени методов являются сложность установок, необходимость применения глубокого вакуума, невозможность модифицировать изделия большого размера или сложной конфигурации. Этих недостатков в определенной степени лишены методы химической газофазной модификации поверхности полимеров, например, сульфирование [12] или фторирование [13].

Настоящая статья посвящена сравнительному исследованию влияния поверхностной модификации пленок полиэтилена методами плазмохимической обработки в вакууме и химической модификации

фторированием и сульфированием на взаимодействие с компонентами крови.

Экспериментальная часть

Полиэтилен широко используют для производства изделий медицинского назначения, в том числе и контактирующих с компонентами крови. При этом свойства его поверхности по гемосовместимости далеки от идеальных. В то же время этот полимер оптимально подходит для формирования на его поверхности мозаичных гидрофильно-гидрофобных структур такими методами, как воздушная плазма тлеющего разряда, поверхностное фторирование и сульфирование.

Для исследований применяли промышленные образцы полиэтилена низкой плотности (ПЭНП) толщиной 100 мкм со следующими характеристиками: прочность при растяжении 14,7 МПа, относительное удлинение при разрыве 300%, средняя молекулярная масса 25000, степень кристалличности 60 – 63%.

Плазмохимическую обработку полимерных образцов проводили в воздушной плазме тлеющего разряда постоянного тока в цилиндрическом реакторе из стекла. Остаточное давление в реакторе составляло 20 ± 10 Па, ток разряда 60 мА.

Фторирование проводили элементарным фтором в смеси с гелием при 20°C и атмосферном давлении по разработанной методике [14].

Сульфирование осуществляли по методике [15] при 50°C, давлении серного ангидрида ниже атмосферного и его концентрации 0,06 кг/м³.

Для варьирования глубины и интенсивности воздействия этих методов на поверхность полиэтилена выбирали различное время обработки при оптимальных значениях других параметров процесса.

Для оценки поверхностных свойств модифицированных образцов определяли поверхностную энергию по краевым углам смачивания (вода и этиленгликоль), ИК-спектры снимали на приборе “ФСМ-1201” методом многократного нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО). Морфологию поверхности изучали с использованием растрового электронного микроскопа Stereoscan-360 фирмы Cambridge Instrument. Фотографирование поверхности полимера, покрытого тонким (5 – 10 нм) слоем золота, осуществляли при 10000-кратном увеличении.

Образцы для дальнейшего исследования на гемосовместимость отбирали по величине гемолиза (влияние поверхности полимера на лизис (разрушение) эритроцитов) индуцированного поверхностью полимера [16, 17]. За количественный

критерий принимали относительную величину гемолиза (α_T) в %

$$\alpha_T = \frac{D_x - D_k}{D_{100} - D_k} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где D_k — оптическая плотность контрольной пробы, D_x — оптическая плотность пробы, инкубируемой с исследуемым полимером, D_{100} — оптическая плотность пробы после 100% гемолиза.

За результат анализа принимали среднее арифметическое значение результатов 5 измерений (образец признавался гемосовместимым, если $\alpha_T \leq 2,0\%$).

Регистрацию адгезии и активации тромбоцитов проводили после инкубации образцов в обогащенной тромбоцитами цитратной (9:1) плазме крови человека и фотографирования их на электронном сканирующем микроскопе Jeol-300 (Япония). За количественную характеристику принимали относительный показатель адгезии тромбоцитов (ОПАТ):

$$\text{ОПАТ} = \frac{N_{\text{обр}}}{N_{\text{контр}}}, \quad (2)$$

где $N_{\text{обр}}$, $N_{\text{контр}}$ — количество тромбоцитов, адгезированных на поверхности тестируемого и контрольного (не обработанный полиэтилен) образцов, соответственно.

Степень активации тромбоцитов на исследуемой поверхности определяли как отношение количества клеток в сильно активированной форме (полностью распластанные и агрегаты) к общему количеству адгезированных тромбоцитов, выраженное в процентах.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 – 3 (нумерация образцов во всех таблицах сквозная) представлены изменения некоторых характеристик поверхности полиэтилена, наблюдаемые при обработке его поверхности.

Таблица 1

Характеристики пленок ПЭНП, обработанных в плазме тлеющего разряда

№ образца	Время обработки, мин	Краевой угол смачивания по воде, $\Theta_{\text{вода}}$	Поверхностная энергия, γ , мН/м	Дисперсионная составляющая, γ^D_s , мН/м	Полярная составляющая, γ^P_s , мН/м	Характерные полосы поглощения в ИК-спектре, см^{-1}
1	Не обработанный	89,5	25,7	21,3	4,4	1600 – 1700 (C=O– слабые)
2	1	43,6	56,0	8,3	47,7	1600 – 1700 (C=O– слабые)
3	3	52,6	48,2	8,2	40,0	1600 – 1700 (C=O– слабые)
4	5	45,4	53,6	10,3	43,3	1600 – 1700 (C=O– слабые)

Таблица 2

Характеристики пленок ПЭНП, обработанных по методу поверхностного фторирования

№ образца	Время обработки, мин	Краевой угол смачивания по воде, $\Theta_{\text{вода}}$	Поверхностная энергия, γ , мН/м	Дисперсионная составляющая, γ^D_s , мН/м	Полярная составляющая, γ^P_s , мН/м	Характерные полосы поглощения в ИК-спектре, см^{-1}
5	5	63,1	39,0	16,3	22,7	1050,1250 (CF, CF ₂)
6	15	60,6	43,7	24,8	18,9	1050,1250 (CF, CF ₂), 1600 – 1700 (C=O о. сл)
7	60	52,2	45,5	18,2	27,3	1050,1250 (CF, CF ₂), 1600 – 1700 (C=O о. сл)
8	180	69,1	45,1	36,2	8,9	1050,1250 (CF, CF ₂), 1600 – 1700 (C=O о. сл)

Таблица 3

Характеристики пленок ПЭНП, обработанных по методу поверхностного сульфирования.

№ образца	Время обработки, мин	Краевой угол смачивания по воде, $\Theta_{\text{вода}}$	Поверхностная энергия, γ , мН/м	Дисперсионная составляющая, γ^D_s , мН/м	Полярная составляющая, γ^P_s , мН/м	Характерные полосы поглощения в ИК-спектре, см^{-1}
9	5	71,7	31,5	10,2	21,3	1040,1165 (S=O), 3050 – 3300 (OH), 1700 (C=O)
10	30	55,0	45,7	9,0	36,7	1040,1165 (S=O), 3050 – 3300 (OH), 1700 (C=O)
11	120	40,8	62,7	3,8	58,9	1040,1165 (S=O), 3050 – 3300 (OH), 1700 (C=O)

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что плазмохимическая обработка приводит к определенному возрастанию гидрофильности поверхности и увеличению ее свободной энергии. Очевидно, что одна из причин этого — образование на поверхности полимера карбонильных групп, о чем свидетельствует появление в ИК-спектрах полосы в области $1600–1780\text{ см}^{-1}$, интенсивность которой возрастает с увеличением времени обработки. Фторирование (табл. 2) приводит к интенсивному замещению атомов водорода в поверхностном слое полимера на атомы фтора, о чем свидетельствуют данные ИК-спектроскопии. Наряду с этим наблюдается образование небольшого количества карбонильных групп (слабая полоса в области $1600–1700\text{ см}^{-1}$) за счет технологической примеси кислорода во фторирующей газовой смеси. Известно, что образование карбонильных групп становится заметным уже при содержании кислорода во фтор-гелиевой смеси в

количестве 3–4 об. % [18]. Хотя в результате фторирования и образуется поверхность, по составу близкая к ПТФЭ, но, по-видимому, наличие карбонильных групп приводит к уменьшению краевого угла смачивания по воде и возрастанию поверхностной энергии. Формируемый при сульфировании (табл. 3) на поверхности полимера модифицированный слой содержит, по данным ИК-спектроскопии, сульфогруппы. Возрастание интенсивности полос поглощения сульфогрупп при увеличении времени сульфирования свидетельствует о росте степени сульфирования. В этой же последовательности закономерно изменяется угол смачивания поверхности водой и увеличивается поверхностная энергия. Хотя все три рассматриваемых метода и приводят к различным структурным изменениям поверхности полиэтилена, однако в целом имеют своим следствием симбатное изменение поверхностной энергии и краевого угла смачивания по воде. Кроме того, в результате этих

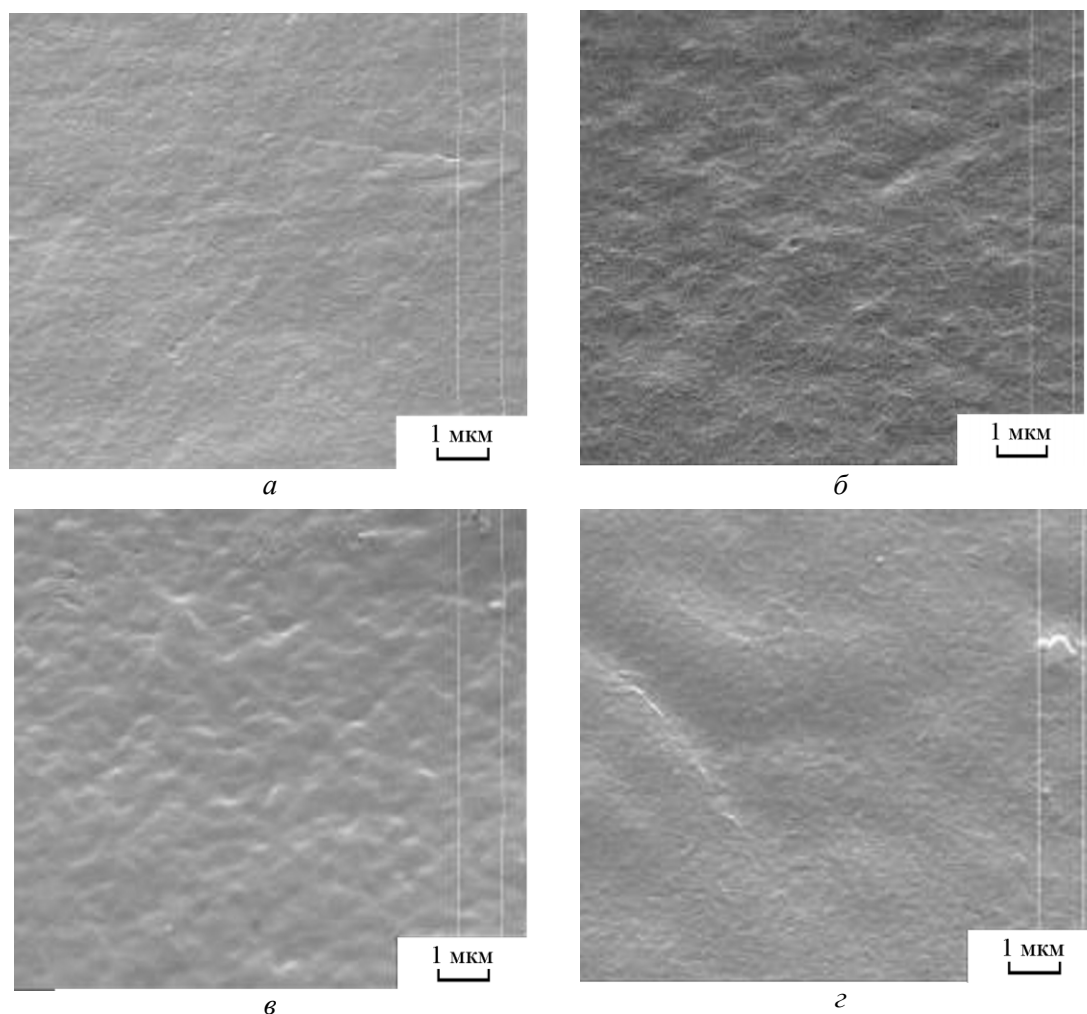


Рис. 1. Электронные микроструктуры поверхности ПЭНП: *а* — исходной пленки, *б* — обработанной в воздушной плазме тлеющего разряда, *в* — фторированной в течение 3 ч, *г* — сульфированной в течение 30 с.

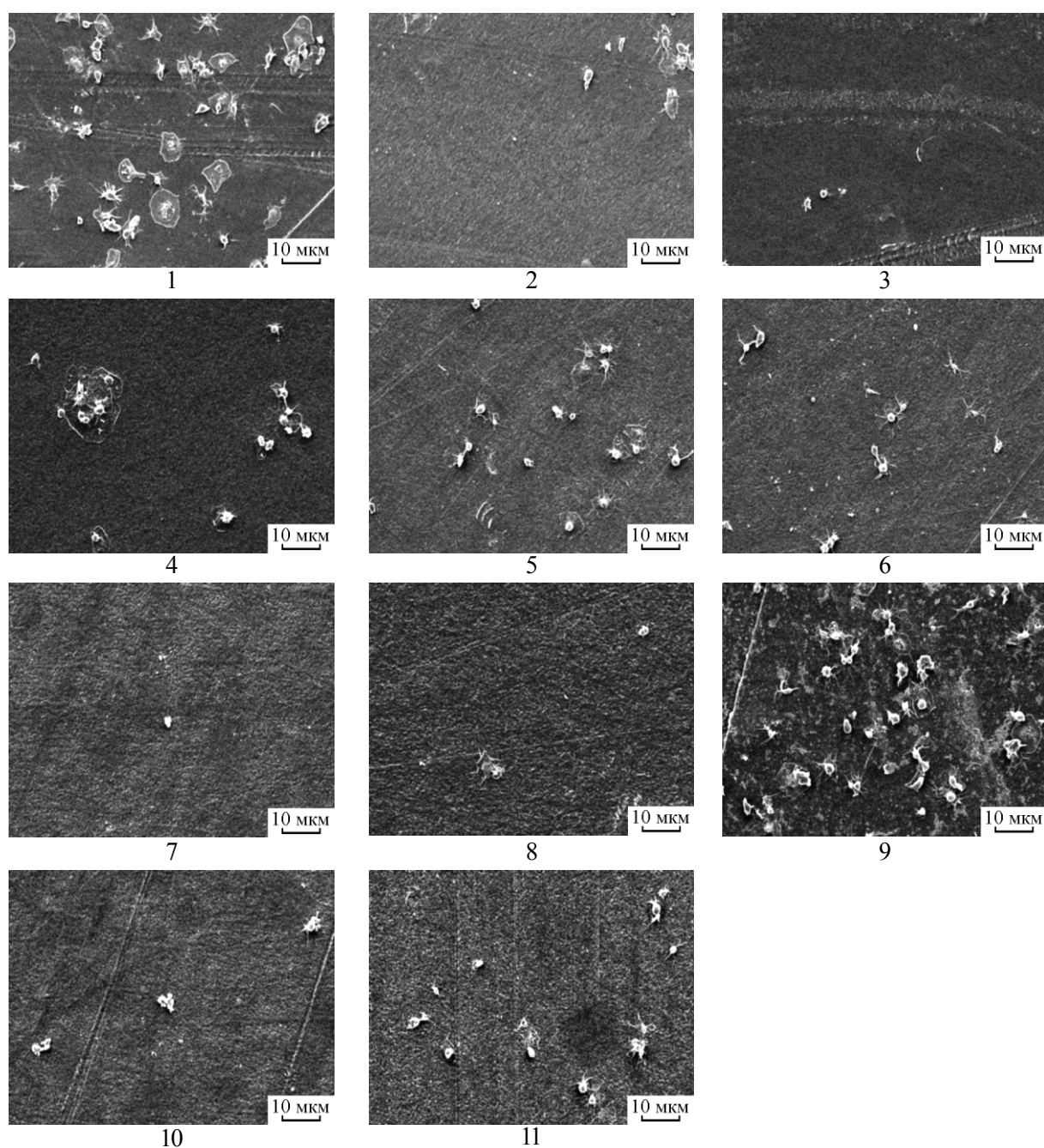


Рис. 2. Микрофотографии исходного и модифицированных образцов ПЭНП после контакта с плазмой крови (номера образцов соответствуют номерам в табл. 1 – 3). Режимы обработки образцов: 1 – не обработанный; плазма тлеющего разряда: 2 – 1 мин, 3 – 3 мин, 4 – 5 мин; фторирование: 5 – 5 мин, 6 – 15 мин, 7 – 60 мин, 8 – 180 мин; сульфирование: 9 – 5 мин, 10 – 30 мин, 11 – 120 мин.

воздействий на поверхности образуются мозаичные структуры с гидрофобными (цепочки исходного полиэтилена или фторсодержащего полиэтилена) и гидрофильными (карбонильные и сульфогруппы) свойствами.

Воздействие на поверхность полиэтилена плазмы тлеющего разряда, фторирующей или сульфиро-

ующего реагента приводит к морфологическим изменениям его поверхности, что четко видно из фотографий, выполненных на электронном микроскопе (рис. 1).

Наблюдаемые при плазмохимической обработке (рис. 1б) морфологические изменения, очевидно, связаны с деструкционной эрозией полимера,

Таблица 4

Параметры гемосовместимости поверхности исходного и модифицированных образцов полиэтилена					
№ образца	Обработка	Время обработки, мин	ОПАТ	Степень активации тромбоцитов, %	α_t , %
1	Не обработанный	—	$1,0 \pm 0,1$	73	$< 0,01$
2	Плазма тлеющего разряда	1	$0,09 \pm 0,02$	65	$< 0,01$
3	—»—	3	$0,05 \pm 0,01$	36	$< 0,01$
4	—»—	5	$0,17 \pm 0,04$	64	0,41
5	Фторирование	5	$0,38 \pm 0,09$	43	$< 0,01$
6	—»—	15	$0,17 \pm 0,04$	46	0,01
7	—»—	60	$0,02 \pm 0,01$	7	$< 0,01$
8	—»—	180	$0,09 \pm 0,03$	49	0,01
9	Сульфирование	5	$0,62 \pm 0,18$	32	$< 0,01$
10	—»—	30	$0,03 \pm 0,01$	69	$< 0,01$
11	—»—	120	$0,28 \pm 0,04$	47	$< 0,01$

которая, судя по отсутствию изменения массы образца, носит исключительно поверхностный характер. Различная скорость этих процессов в аморфных, кристаллических и дефектных областях поверхности, по-видимому, приводит к наблюдаемой волнистости поверхностного слоя. При поверхностном фторировании и сульфировании образование волнистой поверхности, как было показано ранее, связано с изменением химической природы, мольного объема модифицированного слоя и различными скоростями трансформации аморфных и кристаллических областей полимера [19, 20].

На рис. 2 приведены фотографии образцов, иллюстрирующие изменения в характере адгезии и активации тромбоцитов на поверхности полиэтилена в результате ее обработки. Как видно из рис. 2, обработка всеми предложенными методами сопровождается снижением количества адгезированных тромбоцитов, что свидетельствует о повышении гемосовместимых свойств модифицированной поверхности. В то же время в ряде случаев активированные формы адгезированных клеток продолжают составлять значительную долю от их общего количества.

Параметры гемосовместимости поверхности полиэтилена до и после модификации представлены в табл. 4.

Как видно из табл. 4, все исследованные образцы удовлетворяют критериям отбора по тесту на степень гемолиза эритроцитов человека, индуцированную контактом с чужеродной поверхностью.

Обработка в плазме тлеющего разряда в течение 1 – 3 мин сопровождается падением как количества адгезированных тромбоцитов, так и степени их активации (табл. 4). Однако дальнейшее увеличение времени плазмохимической обработки поверхности полиэтилена до 5 мин сопровождается ростом как количества адгезированных тромбоцитов, так и

степени их активации по сравнению с образцами, обработанными в течение 3-х минут.

Количество адгезированных тромбоцитов и степень их активации снижается в результате фторирования поверхности полиэтилена. Однако зависимость степени выраженности этих изменений от времени фторирования носит экстремальный характер: минимальная адгезия и степень активации адгезированных тромбоцитов наблюдается при времени обработки 60 мин. По сравнению с обработкой в плазме тлеющего разряда метод поверхностного фторирования обеспечивает более выраженное снижение как общего количества адгезированных тромбоцитов (критерий ОПАТ), так и степени их активации.

Сульфирование неоднозначно сказывается на параметрах взаимодействия поверхности полиэтилена с тромбоцитами (табл. 4). Так, при времени обработки 30 мин количество адгезированных клеток минимально, в то время как степень их активации — максимальна.

Выводы

Все три метода модификации полиэтилена показали возможность значимого улучшения показателей гемосовместимости его поверхности, что связано, по-видимому, с изменениями в параметрах свободной поверхностной энергии, морфологии поверхности и образованием мозаичных гидрофильно-гидрофобных структур. Вместе с тем, характер изменения гемосовместимости полимера зависит от условий его обработки и различен для каждого из использованных методов. Наиболее перспективным следует признать метод фторирования, применение которого для обработки полиэтилена позволяет достичь максимального эффекта с точки зрения повышения гемосовместимых свойств

поверхности. При этом метод технологичен и позволяет модифицировать готовые изделия различной формы и размеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 08-03-13513 офи_ц и № 10-03-00412а.

Литература

1. Платэ Н.А., Васильев А.Е. Физиологически активные полимеры. М.: Химия, 1986, 294 с.
2. Биосовместимость. Под ред. В.И. Севастьянова. М.: ИЦ ВНИИГС, 1999, 367 с.
3. Biomaterials and Drug Delivery toward New Millennium, Yan Rim Won Publ. Co., Seoul, 2000, ??? p.
4. Sevastianov V.I. Interrelation of protein adsorption and blood compatibility of biomaterials. In: High Performance Biomaterials: A Comprehensive Guide to medical/ Pharmaceutical Application. M.Szycher (ed). Technomic Press, Lancaster, 1991, p. 313 – 341.
5. Немец Е.А. Влияние гидрофильно-гидрофобной наноструктуры поверхности на биологические свойства материалов медицинского назначения. Перспективные материалы, 2005, № 4, с. 58 – 63.
6. Валиев К.А., Великов Л.В., Дорофеев Ю.И., Скурят В.Е. Фототравление полиметилметакрилата в присутствии воздуха светом 123.6 нм. Газообразные продукты и возможный механизм их образования. Химия высоких энергий, 1998, т. 22 (4), с. 352 – 358.
7. Heitz J., Niino H., Yabe A. Surface modification of fluorocarbon polymers by vacuum-UV excimer lamp irradiation reactive gas atmosphere. Appl. Phys. Lett., 1996, v. 68, no. 19, p. 2648 – 2650.
8. Полухина О.С., Василец В.Н., Севастьянов В.И. Модифицирование физико-химических свойств поверхности полиэтиленов медицинского назначения методом прививочной полимеризации моноакрилата поли(этиленоксида), иницированной вакуумным ультрафиолетом. Перспективные материалы, 2003, № 5, с. 58 – 65.
9. Lin J.C., Cooper S.L. Surface characterization and ex vivo blood compatibility of plasma-modified small diameter tubing: effect of sulfur dioxide and hexamethyl-disiloxane plasmas, Biomaterials. Biomaterials, 1995, v. 16, s. 1017 – 1023.
10. Vasilets V.N., Kuznetsov A.V., Sevastianov V.I. Regulation of the biological properties of medical polymer materials with use of a gas-discharge plasma and vacuum ultraviolet radiation. High Energy Chemistry, 2006, № 3, p. 79 – 85.
11. Гильман А.Б., Потапов В.К. Влияние плазменной обработки полимеров на их поверхностные свойства. Прикладная физика. 1995, вып. 3 – 4, с. 14 – 22.
12. Немец Е.А., Егорова В.А., Кузнецов А.В., Севастьянов В.И. Влияние сульфирования поверхности полиэтилена на адсорбцию белков плазмы и активацию внутреннего пути свёртывания крови. Перспективные материалы, 2001, № 6, с. 70 – 75.
13. Назаров В.Г. Поверхностная модификация полимеров. М.: МГУП, 2008, 474 с.
14. Назаров В.Г., Столяров В.А., Евлампиева Л.А., Фокин А.В. Гетерофазное фторирование полимеров. Докл. РАН, 1996, т. 350, № 5, с. 639 – 641.
15. Назаров В.Г. Гетерофазное сульфирование полимеров. Докл. РАН, 1997, т. 352, № 1, с. 60 – 63.
16. Немец Е.А., Севастьянов В.И. Сравнительная эффективность применения гематологических методов для анализа прокоагулянтной активности медицинских материалов. Медицинская техника, 1999, № 6, с. 18 – 22.
17. Сборник методических рекомендаций по оценке биосовместимых свойств искусственных материалов, контактирующих с кровью. Под ред. Н.Б. Добровой, Т.И. Носковой, С.П. Новиковой, В.И. Севастьянова. М.: Изд-во “ВНИТИПРИБОР”, 1991, с. 9 – 10.
18. Назаров В.Г. Состав и размеры поверхностного и переходного слоев в модифицированных полимерах. Высокомолек. соедин. 1997, т. 39Б, № 4, с. 734 – 781.
19. Назаров В.Г., Кондратов А.П., Столяров В.П., Евлампиева Л.А., Баранов В.А., Гагарин М.В. Морфология поверхностного слоя полимеров, модифицированных газообразным фтором. Высокомолекулярные соединения. 2006, т. 48, № 11, с. 1976 – 1985.
20. Назаров В.Г., Столяров В.П., Евлампиева Л.А., Баранов В.А., Гагарин М.В. Моделирование процесса сульфирования и структуры поверхностного слоя полиэтилена. Высокомолекулярные соединения. А., 2009, т. 51, № 3, с. 478 – 489.

Севастьянов Виктор Иванович — ФГУ “Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова”, доктор биологических наук, профессор, руководитель Отдела по исследованию биоматериалов. Специалист в области биоматериаловедения.

Немец Евгений Абрамович — ФГУ “Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова”, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник. Специалист в области модификации поверхности биоматериалов с целью повышения их гемосовместимости.

Столяров Виктор Петрович — 27 Научный центр Министерства обороны РФ, кандидат химических наук, старший научный сотрудник. Область научных интересов: фторирование эластомеров, модификация, морфология и физико-механические свойства полимеров.

Баранов Вадим Александрович — 27 Научный центр Министерства обороны РФ, кандидат технических наук, старший научный сотрудник. Специалист в области эластомеров, фторирования, структуры и физико-механических свойств полимеров.

Божко Николай Николаевич — Московский государственный университет печати, кандидат технических наук, доцент. Специалист в области технологии получения и переработки полимерных материалов, физической химии полимеров и их поверхностного модифицирования в низкотемпературной плазме. E-mail: nnbozhko@mail.ru.

Назаров Виктор Геннадьевич — Московский государственный университет печати, доктор технических наук, профессор, заведующий научно-исследовательской лабораторией. Специалист в области полимерных и композиционных наноматериалов, объемной и поверхностной модификации, структуры и свойств полимеров. E-mail: nazarov2@mtu-net.ru.