

14,13

## Сравнительное исследование структуры и цитотоксичности политетрафторэтилена после ионного травления и ионной имплантации

© Д.В. Штанский<sup>1</sup>, Н.А. Глушанкова<sup>2</sup>, Ф.В. Кирюханцев-Корнеев<sup>1</sup>,  
А.Н. Швейко<sup>1</sup>, А.А. Сигарев<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский технологический университет „МИСиС“,  
Москва, Россия

<sup>2</sup> Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,  
Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский физико-технический институт (Государственный университет),  
Москва, Россия

E-mail: shtansky@shs.misis.ru

(Поступила в Редакцию 31 мая 2010 г.  
В окончательной редакции 15 июля 2010 г.)

Ионно-плазменная обработка широко используется для модификации структуры поверхности полимеров с целью улучшения их свойств, однако может приводить к деструкции поверхности и, как следствие, стать причиной повышения токсичности. Выполнено сравнительное исследование структуры и цитотоксичности политетрафторэтилена (ПТФЭ) после ионного травления (ИТ) и ионной имплантации (ИИ) в течение 10 min с плотностью энергии соответственно 363 и 226 J/cm<sup>2</sup>. Показано, что ИТ в отличие от ИИ приводит к деструкции полимера и появлению цитотоксичности. Обсуждаются причины данного эффекта, связанные с объемным и поверхностным воздействием, а также влиянием температуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК № 02.740.11.0859).

Политетрафторэтилен  $(-CF_2-)_n$ , торговая марка Теллон — это полимерный материал, который обладает большим потенциалом в области биомедицины благодаря уникальному комплексу физических, химических, механических и биологических свойств, таких как высокая гибкость и упругость, химическая инертность в растворах щелочей и кислот, высокая термическая стабильность, низкая теплопроводность, низкий коэффициент трения, био- и гемосовместимость. Политетрафторэтилен (ПТФЭ) находит применение в медицине при эндопротезировании, для изготовления протезов кровеносных сосудов, искусственных перикарда и клапанов сердца.

К недостаткам ПТФЭ в качестве имплантационного материала следует отнести его гидрофобные свойства, низкую адгезивность для клеток организма и полное отсутствие способности устанавливать связь с костной тканью и обеспечивать остеоинтеграцию без образования соединительнотканной прослойки [1]. Именно поэтому ПТФЭ не нашел широкого применения в костно-пластической хирургии, например для закрытия костных дефектов.

Эффективным методом улучшения биоактивных характеристик поверхности полимеров является нанесение на них наноструктурированных покрытий, обеспечивающих полимерным конструкциям принципиально новое качество — высокий интеграционный потенциал в клеточно-тканевой среде [2,3]. С этой целью в покрытия на основе тугоплавких соединений TiC, Ti(C,N), (Ti,Ta)C

и (Ti,Ta)(C,N) вводятся дополнительные элементы Ca, Zr, Si, O и P, которые улучшают механические и трибологические свойства материала, а также обеспечивают биоактивные свойства поверхности и биосовместимость [4–7]. Неорганические добавки CaO, ZrO<sub>2</sub>, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, TiO<sub>2</sub>, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> и Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> вводятся уже на этапе получения методом самораспространяющегося высокотемпературного синтеза композиционных мишеней для ионно-плазменного осаждения покрытий.

Ионно-плазменная обработка широко используется для изменения структуры поверхности полимеров с целью улучшения свойств поверхности: износостойкости, смачиваемости, проводимости и др. [8,9]. Вопросы модифицирования поверхности полимеров достаточно подробно рассматривались в научной литературе [10,11]. Обычно энергетическая обработка поверхности приводит к разрыву химических связей и снижению кристалличности [12,13]. В то же время путем химической и топографической модификации поверхности полимеров ионным пучком возможно управление процессом адгезии клеток [14]. Вместе с тем деструкция поверхности ПТФЭ и образование свободных радикалов может стать причиной повышения токсичности, которая, например, наблюдается при термическом распаде полимеров, при этом максимальная токсичность наблюдалась в температурном интервале 400–650 °C [15].

Подготовка поверхности подложек перед нанесением покрытия обычно включает стадию ионного травления. Для улучшения адгезионной прочности покрытий с

Таблица 1. Пролiferация остеобластов MC3T3-E1

Материал	1 день	3 день	5 день	7 день	Примечание
Пролiferация MC3T3-E1 на ПТФЭ					
Стекло (контроль)	18.50 ± 1.32	27.90 ± 1.48	38.00 ± 2.58	55.40 ± 3.23	Нормальный рост
ПТФЭ	16.00 ± 0.91	12.3 ± 1.6	35.10 ± 2.53	33.40 ± 4.66	Рост клеток замедлен
ПТФЭ + ИТ	19.10 ± 1.35	20.90 ± 1.78	13.40 ± 0.89	18.80 ± 1.84	Цитотоксический эффект. Клетки на пластинках не размножаются
ПТФЭ + ИИ	25.20 ± 1.46	22.90 ± 1.27	30.50 ± 1.87	57.60 ± 2.74	Количество клеток сравнимо с контролем
Пролiferация MC3T3-E1 на стекле в присутствии ПТФЭ					
ПТФЭ	41.40 ± 2.51	Нет	65.60 ± 2.96	128.9 ± 5.8	Нет цитотоксического эффекта
ПТФЭ + ИТ	35.80 ± 1.66	46.10 ± 2.24	32.23 ± 1.77	65.50 ± 1.94	Цитотоксический эффект
ПТФЭ + ИИ	35.00 ± 1.95	77.00 ± 3.34	90.57 ± 4.25	124.60 ± 4.38	Нет цитотоксического эффекта

подложкой также используется высокоэнергетическая ионная бомбардировка, позволяющая создать плавный переходный слой на границе раздела. Целью настоящей работы является исследование влияния различных видов энергетической обработки поверхности на структуру и цитотоксичность ПТФЭ.

Ионное травление (ИТ) поверхности ПТФЭ проводили с использованием ионного источника щелевого типа ионами  $Ar^+$  со средней энергией 1.5 keV и плотности ионного потока  $1.5 \cdot 10^{16} \text{ ion} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  в течение 10 min. Ионную имплантацию (ИИ) осуществляли высокоэнергетическими ионами титана со средней энергией 70 keV в течение 10 min. Ускоряющее напряжение и плотность ионного потока соответственно составляли 35 keV и  $2 \cdot 10^{14} \text{ ion} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Плотности энергии при различных видах энергетической обработки поверхности отличались в 1.6 раза и составляли  $363 \text{ J/cm}^2$  (ИТ) и  $226 \text{ J/cm}^2$  (ИИ).

В работе использовали пленки и пластины из ПТФЭ размером соответственно  $10 \times 10 \times 0.1$  и  $10 \times 10 \times 3 \text{ mm}$ . Для точного измерения температуры в процессе модификации поверхности термпару непосредственно фиксировали в пластине ПТФЭ. При ИТ температура подложки достигала  $300^\circ\text{C}$ , тогда как при ИИ она составляла  $190^\circ\text{C}$ .

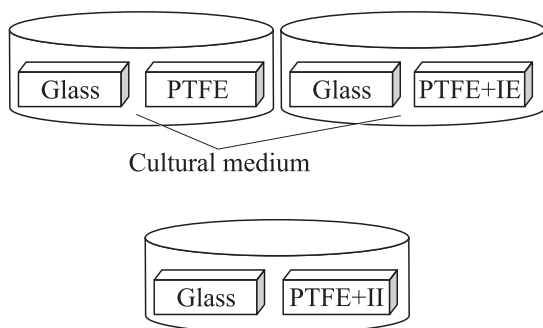


Рис. 1. Схема проведения эксперимента на цитотоксичность.

Структуру поверхности ПТФЭ исследовали методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФС) на спектрометре PHI 5500 ESCA (PerkinElmer, США). Съемку проводили на излучении  $Mg K_{\alpha}$  при мощности 300 W и напряжении 14 kV. Диаметр области анализа составлял 1.1 mm, давление остаточных газов в камере анализа —  $7 \cdot 10^{-8} \text{ Pa}$ . Предварительное травление подложки ионами аргона не применялось.

Исследование влияния травления ионами  $Ag^+$  на структуру поверхности образцов ПТФЭ проводили методом инфракрасной (ИК) Фурье-спектроскопии многократного нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО). Спектры поглощения образцов ПТФЭ в среднем ИК-диапазоне измерялись с использованием ИК Фурье-спектрметра Perkin-Elmer „Spectrum 100“, снабженного приставкой МНПВО с ZnSe-элементом в форме призмы, рассчитанной на десять внутренних отражений при падении ИК-излучения под углом  $45^\circ$ . Образцы ПТФЭ прижимались к рабочей поверхности элемента МНПВО при помощи специальной плоской металлической пластины, входящей в состав держателя образцов.

При оценке биоактивности материалов одним из важнейших критериев является динамика роста клеток на их поверхности, позволяющая оценить наличие или отсутствие цитотоксичности у данных материалов. Сравнительные исследования кинетики пролиферации остеобластов MC3T3-E1 на поверхности ПТФЭ проводили путем окрашивания DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола) клеток, фиксированных через 1, 3, 5 и 7 дней после посева, и подсчета количества ядер в 30 полях зрения. На первом этапе исследовали пролиферацию остеобластов на поверхности пластин ПТФЭ, помещенных в чашку Петри с культуральной средой DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки. Были исследованы три группы пластин: 1) без обработки, 2) после ИТ и 3) после ИИ. Адгезивные стекла (Menzelglaser) служили для контроля. На втором этапе в чашку Петри со средой для культивирования клеток помещали ад-

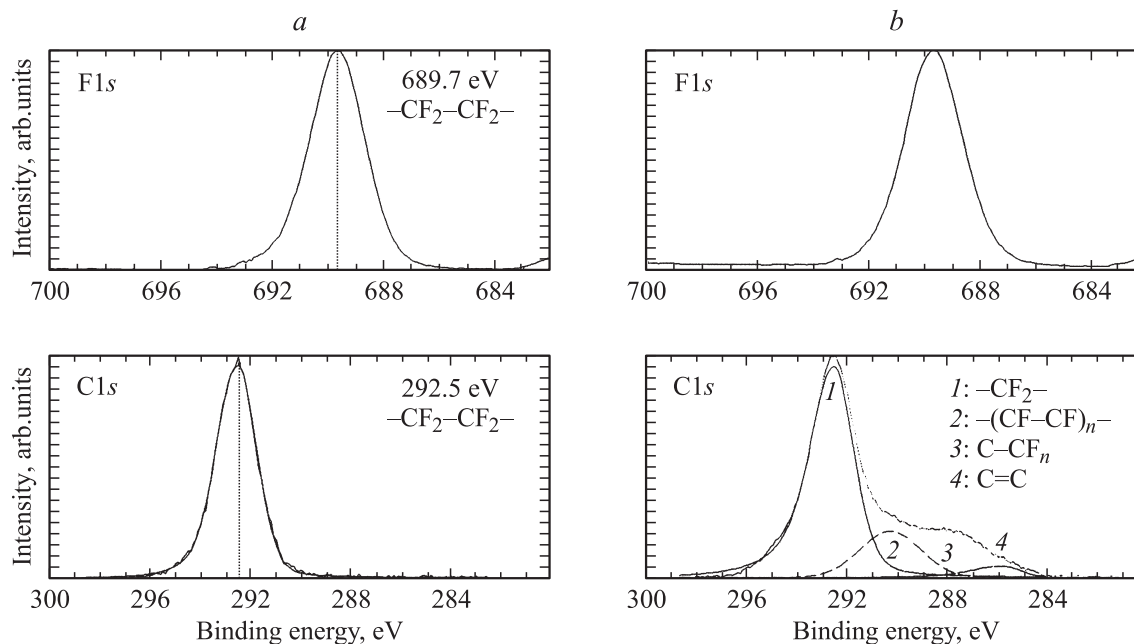


Рис. 2. Рентгеновские фотоэлектронные спектры образцов ПТФЭ. *a* — исходный, *b* — после ионного травления.

гезивное стекло, а на дно чашки рядом с пластинкой стекла укладывали пластинку ПТФЭ, как показано на рис. 1. Так же как и в первом случае, рассеивали остеобласты и через 1, 3, 5 и 7 дней фиксировали клетки. После окраски клеток DAPI подсчитывали количество клеток в 30 полях зрения, растущих на адгезивных стеклах, а затем вычисляли среднее значение плотности популяции.

Полученные результаты исследования цитосовместимости образцов ПТФЭ представлены в табл. 1. Видно, что рост клеток на пластинах ПТФЭ без обработки существенно замедлен по сравнению с контролем (адгезивное стекло). На различных стадиях наблюдений мы не обнаружили статистически существенной разницы в популяции клеток на поверхности стекла и ПТФЭ после ИИ. В то же время количество клеток в поле зрения на поверхности ПТФЭ после ИТ было существенно ниже, чем во всех остальных случаях, что свидетельствует о наличии цитотоксического эффекта.

Аналогичные результаты были получены при исследовании пролиферации остеобластов на поверхности стекла в присутствии пластины ПТФЭ. Присутствие образца ПТФЭ без обработки поверхности и образца после ИИ не оказывало негативного воздействия на пролиферацию остеобластов на соседнем стекле. В то же время наличие образца ПТФЭ после ИТ оказывало ярко выраженный цитотоксический эффект на клетки.

Для исследования влияния ИТ на структуру и элементный состав ПТФЭ проводили структурные исследования методами РФС и ИК Фурье-спектроскопии.

В табл. 2 приведены составы образцов ПТФЭ. В исходном состоянии отношение F/C ≈ 2, что соответствует цепочке (-CF<sub>2</sub>-CF<sub>2</sub>-), тогда как после ИТ величина

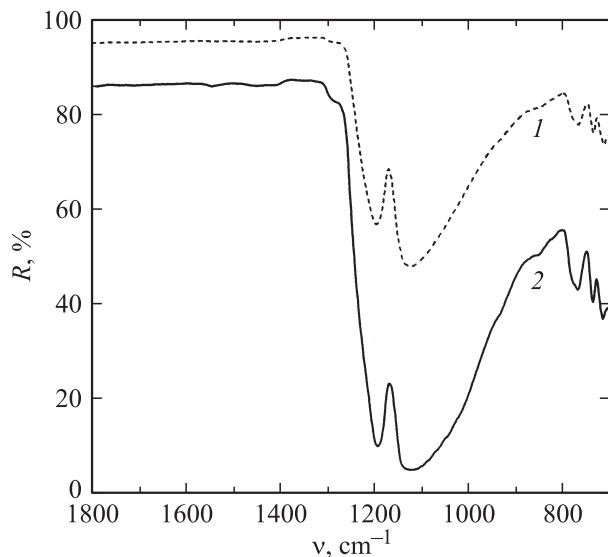
F/C падает до 1.52. В исходном состоянии кислород обнаружен не был, что соответствует высокой химической инертности ПТФЭ, однако после ИТ его содержание составляет 1.3 at. %.

На рис. 2 приведены рентгеновские фотоэлектронные спектры высокого разрешения линий F1s и C1s для двух типов образцов ПТФЭ. В исходном образце положение и форма линий F1s (689.7 eV) и C1s (292.5 eV) точно соответствуют справочным данным по энергии связи ПТФЭ [16]. После ИТ положение линии F1s не изменяется, однако для линии C1s наблюдается уширение спектра в сторону более низких значений энергии связи, что свидетельствует о суперпозиции нескольких линий, соответствующих различным химическим состояниям. Аппроксимация спектра выявила три дополнительных пика с энергией связи 290.3, 287.7 и 285.8 eV, которые соответственно можно отнести к группам -(CF-CF)<sub>n</sub>-, C-CF<sub>n</sub> и связям C=C [17-19]. Это обстоятельство свидетельствует о том, что произошла деструкция полимера, обеднение поверхности фтором и, как следствие, образование связей C=C.

На рис. 3 показаны ИК-спектры МНПВО исходного и модифицированного образцов ПТФЭ в диапазоне волновых чисел 1800–700 см<sup>-1</sup>. Наиболее интенсивные

Таблица 2. Элементный состав образцов ПТФЭ

Образец	Элементный состав, at. %			
	C	F	O	F/C
ПТФЭ	33.5	66.5	—	1.99
ПТФЭ + ИТ	39.1	59.6	1.3	1.52



**Рис. 3.** Спектры МНПВО поверхности ПТФЭ (1 — исходного, 2 — после ионного травления) в диапазоне волновых чисел 1800–700  $\text{cm}^{-1}$ . Использовался элемент МНПВО из ZnSe, угол падения излучения  $45^\circ$ .

полосы поглощения ПТФЭ в области 1300–800  $\text{cm}^{-1}$  соответствуют антисимметричным и симметричным валентным колебаниям групп  $\text{CF}_2$  [20]. Отметим, что при измерениях методом МНПВО исследуется весьма тонкий поверхностный слой ПТФЭ, примыкающий к поверхности элемента МНПВО. Толщина этого зондируемого слоя является спектрально-зависимой и составляет величину порядка длины волны ИК-излучения [21]. Это связано с экспоненциальным затуханием поля ИК-волны при удалении от границы раздела элемент МНПВО–исследуемый образец. Для рассматриваемого здесь интервала длин волн глубина проникновения затухающего поля ИК-волн в образец находится в пределах 6–15  $\mu\text{m}$ , что значительно меньше толщины исследуемого образца ПТФЭ.

Наблюдаемое на рис. 3 существенное ослабление полос поглощения валентных колебаний  $\text{CF}_2$ -групп в области 1300–900  $\text{cm}^{-1}$  связано с деструкцией связей С–F и возможной аморфизацией кристаллических областей в поверхностном слое образца ПТФЭ под воздействием пучка ионов аргона. Неселективное уменьшение коэффициента отражения  $R$  в широкой области волновых чисел, не содержащей селективных полос поглощения ПТФЭ, для модифицированного образца ПТФЭ по сравнению с исходным может быть связано с увеличением рассеяния зондирующего ИК-излучения на неоднородностях поверхности облученного образца. Увеличение степени шероховатости поверхности модифицированного образца ПТФЭ может быть связано с неоднородным травлением кристаллических и аморфных участков приповерхностного слоя при облучении ионным пучком.

Таким образом, установлено, что ИТ образцов ПТФЭ при плотности ионного потока  $1.5 \cdot 10^{16} \text{ ion} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

и средней энергии ионов 1.5 keV приводит к деструкции полимера и появлению цитотоксического эффекта. ИИ при плотности ионного потока  $2 \cdot 10^{14} \text{ ion} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , в котором присутствуют ионы  $\text{Ti}^+$ ,  $\text{Ti}^{2+}$  и  $\text{Ti}^{3+}$  со средней энергией ионов  $\text{Ti}^{2+}$ , равной 70 keV, не приводит к появлению токсичности. По-видимому, это связано с объемным воздействием ИИ, при котором не происходит разрыва химических связей  $(-\text{CF}_2-)_n$  в отличие от поверхностного воздействия при ИТ. Продукты деструкции оказывают токсическое воздействие на клетки, не только рассеянные на поверхности модифицированного полимера, но и находящиеся на поверхности соседнего образца в культуральной среде. После деструкции в ПТФЭ образуются короткие фтор-углеродные цепочки с внедрением кислорода, что может приводить к образованию кислот, альдегидов и даже кетонов, которые либо являются токсичными сами по себе, либо, вступая в химическое взаимодействие внутри среды, приводят к образованию токсичных соединений. Эти легкие летучие и потому реактивные органические молекулы трудно обнаружить методами РФС и ИК-спектроскопии. Их может быть совсем мало, потому их вклад в спектр будет незначителен. Также нельзя сбрасывать со счета и температурный фактор. Известно, что при термическом разложении ПТФЭ возможно образование различных высокотоксичных соединений, таких как перфтороктановая кислота  $\text{C}_7\text{F}_{15}\text{COOH}$ , перфторизобутилен  $\text{C}_4\text{F}_8$ , тетрафторэтилен  $\text{C}_2\text{F}_4$ , и ряда других. Возможно, деструкция ПТФЭ при ИТ связана с более высокой температурой нагрева подложки до  $300^\circ\text{C}$ , что на  $100^\circ\text{C}$  выше, чем в случае ИИ.

Авторы признательны Е.А. Скрылёвой за помощь в проведении РФС-исследований.

## Список литературы

- [1] L.L. Hench, J. Wilson. *Science* **226**, 630 (1984).
- [2] А.А. Кулаков, А.С. Григорьян, М.Р. Филонов, Д.В. Штанский, А.К. Топоркова. *Стоматология* **2**, 8 (2009).
- [3] А.С. Григорьян, М.Р. Филонов, Д.В. Штанский, И.И. Селезнёва, А.К. Топоркова. *Стоматология. Спецвыпуск*, **20** (2007).
- [4] Д.В. Штанский, И.А. Башкова, Ф.В. Кирюханцев-Корнеев, А.Н. Швейко, Е.А. Левашов, Д. Мур, Н.А. Глушанкова. *ДАН* **418**, 121 (2008).
- [5] Д.В. Штанский, И.А. Башкова, Е.А. Левашов, Т.А. Чипышева, Ю.М. Васильев, Н.А. Глушанкова. *ДАН* **404**, 267 (2005).
- [6] D.V. Shtansky, N.A. Glushankova, I.A. Bashkova, M.A. Kharitonova, T.G. Moizhess, A.N. Sheveiko, F.V. Kiryukhantsev-Korneev, M.I. Petrzhik, E.A. Levashov. *Biomaterials* **27**, 3519 (2006).
- [7] D.V. Shtansky, N.A. Glushankova, A.N. Sheveiko, M.A. Kharitonova, T.G. Moizhess, E.A. Levashov, F. Rossi. *Biomaterials* **26**, 2909 (2005).
- [8] A. Tóth, K. Kereszturi, M. Mohai, I. Bertóti. *Suf. Coat. Technol.* doi:10.1016/j.surfcoat.2009.12.004.

- [9] T.L. Schiller, D. Sheeja, D.R. McKenzie, D.G. McCulloch, D.S.P. Lau, S. Burn, B.K. Tay. Surf. Coat. Technol. **177–178**, 483 (2004).
- [10] M. Ikeyama, Y. Hayakawa, M. Tasawa. Thin Solid Films **281–282**, 529 (1996).
- [11] T.W.H. Oates, D.R. McKenzie, M.M.M. Bilek. Surf. Coat. Technol. **156**, 332 (2002).
- [12] M. Adami, L. Guzman, B.Y. Man, A. Miotello, P.M. Ossi. Thin Solid Films **459**, 318 (2004).
- [13] A. Oshima, Y. Tabata, H. Kdoh, T. Seguchi. Rad. Phys. Chem. **45**, 269 (1995).
- [14] G.T. Guibert, T. Rossel, G. Weder, S. Mikhailov, C. Meunier, B. Betschart. Eur. Cells Mater. **16**, Suppl. 1, 12 (2008).
- [15] D.A. Purser. Fire Mater. **16**, 67 (2004).
- [16] G. Beamson, D. Briggs. High resolution XPS of organic polymers. John Wiley & Sons Ltd, Chichester (1992). 306 p.
- [17] H. Biederman, M. Zeuner, J. Zalman, P. Bílková, D. Slavínská, V. Stelmasuk, A. Boldyreva. Thin Solid Films **393**, 208 (2001).
- [18] C. Biloiu, I. Biloiu, Y. Sakai, Y. Suda, A. Ohta. J. Vac. Sci. Technol. A **22**, 1, 13 (2004).
- [19] X. Ma, G. Tang, M. Sun. Surf. Coat. Technol. **201**, 7641 (2007).
- [20] Л. Беллами. Инфракрасные спектры сложных молекул. ИИЛ, М. (1963). 590 с.
- [21] Н. Харрик. Спектроскопия внутреннего отражения. Мир, М. (1970). 335 с.