

14,13

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

© Д.В. Штанский¹, Н.А. Глушанкова², Ф.В. Кирюханцев-Корнеев¹,
А.Н. Швейко¹, А.А. Сигарев³

¹ Национальный исследовательский технологический университет „МИСиС“, Москва, Россия

² Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия

³ 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/cm². 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 Телфон — 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, ZrO₂, Si₃N₄, TiO₂, Ca₃(PO₄)₂ и Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ 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. Пролиферация остеобластов MC3T3-E1

Материал	1 день	3 день	5 день	7 день	Примечание
Пролиферация 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
Пролиферация 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 J/cm^2 (ИТ) и 226 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°C , тогда как при ИИ она составляла 190°C .

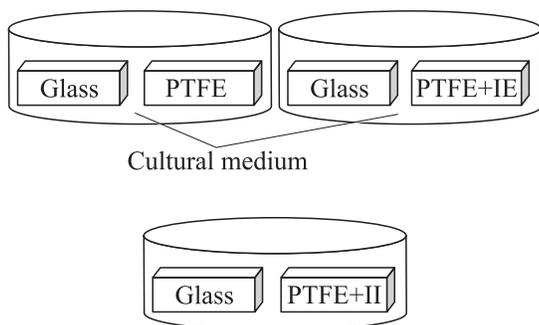


Рис. 1. Схема проведения эксперимента на цитотоксичность.

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° . 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-

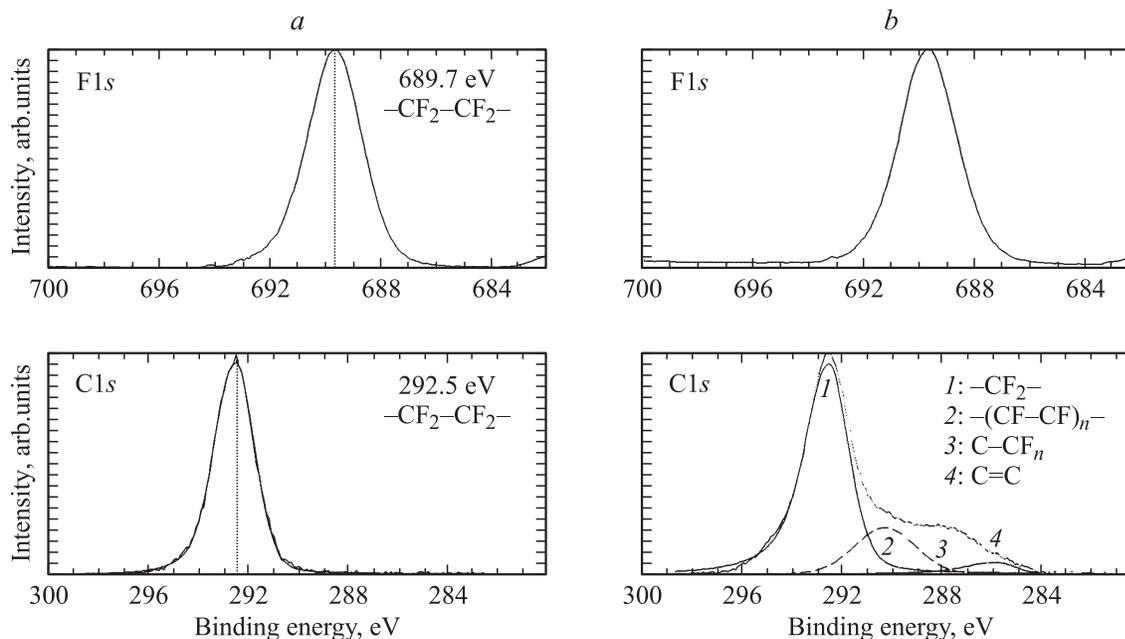


Рис. 2. Рентгеновские фотоэлектронные спектры образцов ПТФЭ. *a* — исходный, *b* — после ионного травления.

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 $F/C \approx 2$, что соответствует цепочке $(-CF_2-CF_2-)$, 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 $-(CF-CF)_n-$, $C-CF_n$ 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 $1800-700\text{ cm}^{-1}$. 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

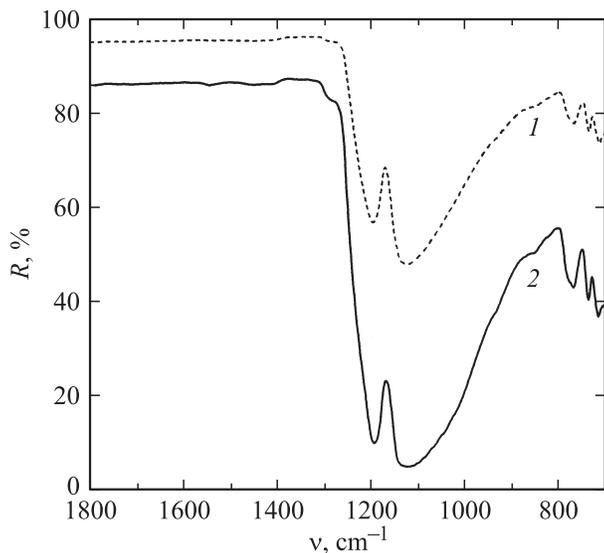


Рис. 3. Спектры МНПВО поверхности ПТФЭ (1 — исходного, 2 — после ионного травления) в диапазоне волновых чисел 1800–700 cm^{-1} . Использовался элемент МНПВО из ZnSe, угол падения излучения 45° .

полосы поглощения ПТФЭ в области 1300–800 cm^{-1} соответствуют антисимметричным и симметричным валентным колебаниям групп 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 μm , что значительно меньше толщины исследуемого образца ПТФЭ.

Наблюдаемое на рис. 3 существенное ослабление полос поглощения валентных колебаний CF_2 -групп в области 1300–900 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 Ti^+ , Ti^{2+} и Ti^{3+} со средней энергией ионов 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 C_4F_8 , тетрафторэтилен C_2F_4 , и ряда других. Возможно, деструкция ПТФЭ при ИТ связана с более высокой температурой нагрева подложки до 300°C , что на 100°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. Surf. 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.