

УДК 541.183:532.64

МОДИФИЦИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИСТИРОЛА КОМПЛЕКСОМ БЫЧИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН– ТВИН-80 И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ

Г.П. Ямпольская, В.Д. Должикова

(кафедра коллоидной химии; e-mail: dol@colloid.chem.msu.ru)

Проведено модифицирование поверхности полистирола комплексом БСА–Твин-80. Методом пьезоэлектрического взвешивания изучены адсорбция комплекса и образование пленок на поверхности полистирола. Состояние модифицированной поверхности оценено по краевым углам. Стабильность модифицирующего слоя определена по критериальным значениям межфазной энергии поверхности, приведенной в равновесие с водой. Сделан вывод об эффективности использования комплекса для повышения биосовместимости полимерных материалов.

Полимерные материалы широко используются в биомедицине при изготовлении имплантов (органы, сосуды и ткани из синтетических материалов), а также для других целей (изготовление мембран, катеторов, гемодиализаторов, контейнеров для хранения крови, биосенсоров, контейнеров для переноса лекарственных веществ и др.). Во всех случаях такие материалы должны быть биоинертными и биосовместимыми.

Результаты многолетних усилий исследователей [1–3] позволяют выделить общие проблемы биосовместимости, а также специальные, связанные с конкретными условиями использования биоматериалов. Так, например, материал для замены кровеносных сосудов прежде всего должен быть кровесовместимым, что подразумевает низкую адгезию клеточных структур крови (тромбоцитов, лейкоцитов, макрофагов и др.) к поверхности имплантируемого материала. Адгезия тромбоцитов провоцирует тромбоз. Известно, что при контакте полимерного материала с кровью на его поверхности адсорбируются белки плазмы [4, 5], причем адсорбция сывороточного альбумина даже способствует кровесовместимости [6, 7], а фибриногена усиливает адгезию тромбоцитов, в результате чего включается активация комплемента – начальная стадия тромбообразования [8, 9]. Заметим также, что адсорбированный на поверхности материала сывороточный альбумин должен сохранять нативную конформацию, в противном случае кровесовместимость материала резко ухудшается [4, 6]. Кроме того, материал не должен адгезировать болезнетворные бактерии, которые являются причиной воспалительных процессов, сопровождающих имплантирование [10]. Повышение адсорбции сывороточных белков, особенно в денатурированном состоянии, также приводит к усилению адгезии бактерий. Таким обра-

зом, тромбогенность и вероятность воспалительных процессов – это главные осложняющие проявления при имплантации контактирующих с кровью искусственных материалов [11].

Материалы медицинского назначения тестируются с помощью ряда пригодных для данной цели биологических методик, использующихся в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Однако исторически (и этот подход не потерял своего значения до настоящего времени) материалы отбираются на основе изучения их механических и поверхностных свойств. В качестве характеристики последних широко (практически во всех работах) используются краевые углы воды (углы натекания θ_a). Исследования показывают, что поверхности должны быть в определенной мере гидрофильными. Проведение корреляции между величиной краевого угла и биосовместимостью материала [7, 10, 12–17] позволило установить, что если значение краевых углов капель воды на поверхности составляет $\sim 60^\circ$, то в первом приближении материал пригоден для использования в медицинских целях. В связи с этим большое распространение получили разные способы гидрофилизации (увеличение смачиваемости) исходно гидрофобных поверхностей полимеров [7, 10–25], среди которых можно указать на модификацию поверхности липидами [10, 13, 16, 19, 20], гепарином [18, 21], прививкой к поверхности гидрофильных мономеров [22], частичным окислением поверхности с образованием связей C–O, C=O и O–C–O– [17]. Особенно широко в последнее время прибегают к модификации поверхности полимеров полиэтиленгликолями [7, 12, 14, 15, 23, 24].

Улучшение биосовместимости материалов при модификации поверхностей полиэтиленгликолями отмечено в монографии [25]. Однако приведенное значение краевого угла лишь грубо указывает на биосов-

местимость, поскольку эффекты смачивания могут зависеть от микрогетерогенности (нанотопографии [14]), шероховатости [26, 14] поверхности, пористости [27], а также структуры и объема модифицирующего слоя [28].

Проблема выбора медицинских материалов по механической устойчивости поверхности в биологических средах также решается на основании измерений смачиваемости. В этом случае прибегают к измерению гистерезиса краевых углов (разница краевых углов натекания θ_a и отекания θ_r). Гистерезис краевого угла $\Delta\theta = \theta_a - \theta_r$ указывает на изменение поверхностных свойств материала. Таким способом в [12] обнаружена реорганизация поверхности мембраны при изменении контактирующей среды (воздух или вода). Наступающий краевой угол (θ_a) в зависимости от содержания ПЭГ изменяется от 96° до 126° , а отступающий угол отекания (θ_r) – от 20° до 60° , что указывает на увеличение доли ПЭГ на поверхности в водном окружении. Исследования, связанные с разработкой критериев биосовместимости [29], показали, что поведение полимера в биологической среде определяет величина межфазной энергии полимер–вода (σ_{SL}). Для биосовместимых материалов величина σ_{SL} должна быть близка к межфазному натяжению на границе клетка–вода. В то же время полимер не должен обнаруживать заметного понижения прочности при контакте с растворителем во избежание его диспергирования в жидкую среду. В соответствии с концепцией Е. Рукенштейна [29] компоненты поверхностной энергии, в особенности дисперсионные составляющие поверхностной энергии твердого тела, не зависят от природы неполярной среды, т.е. одинаковы для всех углеводов и для воздуха. Полярные компоненты могут изменяться при длительном контакте полимера с полярной фазой. Для характеристики поверхности твердого тела существенное значение приобретают две равновесные величины: поверхностная энергия полимера в неполярном окружении (σ_{SO}) и поверхностная энергия полимера в полярном окружении (σ_{SW}). В работе [29] представлена методика определения σ_{SL} на основании метода смачивания и проведена критериальная оценка кровесовместимости ($\sigma_{SL} \approx 3$ мДж/м²).

На основании вышесказанного можно сделать вывод, что в качестве биосовместимых материалов весьма перспективными могут быть полимеры, модифицированные сывороточным альбумином, а также комплексами белок–неионогенное ПАВ, содержащее (по аналогии с ПЭГ) оксиэтильные цепочки.

Настоящая работа посвящена исследованию возможности использования таких поверхностей в качестве биосовместимых материалов. Для исследования была выбрана модельная система полистирол–бычий сывороточный альбумин (БСА, молекулярная масса $M = 67000$) и полистирол–комплекс БСА–Твин-80 (TW-80). TW-80 – оксиэтилированный моноолеат сорбитана со средней степенью оксиэтилирования $n = 20$, $M = 1308$. Особенности взаимодействия TW-80 с БСА подробно изучены в работах [30, 31]. Вначале измеряли адсорбцию БСА, TW-80 и комплекса БСА–TW-80 на поверхности полистирола методом пьезоэлектрического микровзвешивания (ПМ) [32]. Это необходимо для количественной оценки степени заполнения поверхности полистирола модифицирующим слоем. Область исследованных концентраций водных растворов TW-80 составляла 10^{-7} – 10^{-2} М*, концентрация БСА ($C_{БСА}$) – 10^{-4} и 10^{-5} М. Комплекс БСА–TW-80 (1:1) изучали в области концентраций 10^{-7} – 10^{-5} М. Узкая область исследованных концентраций комплекса ($C_{комп}$) обусловлена тем, что при $C_{комп} > 10^{-5}$ М образующийся комплекс нерастворим в воде, и в растворе наблюдается разделение фаз.

Метод ПМ является прямым методом измерения адсорбции и основан на зависимости частоты колебаний кварцевого резонатора (f) – датчика микровесов – от количества вещества (m), нанесенного на его поверхность [33]. По изменению частоты колебаний Δf (Гц) рассчитывают адсорбцию Γ по уравнению:

$$\Gamma = \Delta m/S = -\Delta f/C_f, \quad (1)$$

где Δm – масса адсорбированного на поверхности резонатора вещества, C_f – коэффициент массовой чувствительности, зависящий от свойств пьезокварца, S – площадь рабочей поверхности резонатора. В работе использовали кварцевые резонаторы АТ-среза с серебряными электродами и собственной частотой колебаний ($f_0 = 5$ МГц), для которых $C_f = 2,27 \cdot 10^{-6}$; $f_0^2 = 56,75 \cdot 10^6$ Гц·см²·г⁻¹ [32]. Адсорбцию Γ (г/см²) рассчитывали по уравнению:

$$\Gamma = -1,76 \cdot 10^{-8} \Delta f. \quad (2)$$

В методе ПМ адсорбент либо напыляют, либо наносят в виде тонкой пленки на поверхность датчика. Полимерные пленки наносят обычно из органического растворителя (полистирольные пленки наносили из 0,5%-го раствора полимера в толуоле). Толщина пленок составляла 200 нм. По методике Рукенштейна на основании измерения краевых углов нате-

*ККМ – критическая концентрация мицеллообразования ($\text{ККМ}_{\text{TW-80}} = 1,4 \cdot 10^{-4}$ М).

кания, отекания и в условиях избирательного смачивания рассчитывали полярную и дисперсионную составляющие межфазного натяжения твердой поверхности, приведенной в равновесие с водой ($\sigma_{SW(W)}$). При определенных допущениях эта величина определяется уравнением:

$$\sigma_{SW(W)} = \{(\sigma_W^p)^{1/2} - (\sigma_{SW}^p)^{1/2}\}^2 + \{(\sigma_W^d)^{1/2} - (\sigma_{SW}^d)^{1/2}\}^2, \quad (3)$$

где σ_W^p и σ_W^d – полярная и дисперсионная составляющие поверхностного натяжения воды соответственно, σ_{SW}^p и σ_{SW}^d – полярная и дисперсионная составляющие межфазного натяжения на границе твердая поверхность–вода. Определение двух последних величин проводили по краевым углам отекания воды при подведении пузырька воздуха (θ_{VW}) и капли октана (θ_{OW}) к поверхности образца, предварительно выдержанного в воде в течение 12 ч и помещенного в воду. Расчет проводили по уравнениям (4) и (5):

$$\sigma_{SW}^p = (-\sigma_{OW} \cos \theta_{OW} + \sigma_W - \sigma_O)^2 / 4 \sigma_W^p, \quad (4)$$

$$\sigma_{SW}^d = (\sigma_{OW} \cos \theta_{OW} - \sigma_W \cos \theta_{VW} + \sigma_O)^2 / 4 \sigma_O. \quad (5)$$

Межфазное натяжение октан–вода (σ_{OW}) составило 21,8 мДж/м² (энергетические характеристики воды и октана представлены в табл. 1).

Для модифицирования пленок полистирола водными растворами БСА, TW-80 и комплекса БСА–TW-80 образцы выдерживали 30 мин в соответствующих растворах, затем промывали в воде и высушивали. Перед измерениями краевых углов пленки выдерживали в воде в течение 12 ч.

Адсорбция TW-80 на полистироле резко возрастает при $C > \text{ККМ}$ (рис. 1), что обычно связывают с адсорбцией мицелл на твердой поверхности [34]. При монослойном заполнении полистирола площадь на молекулу TW-80 (S_m) в адсорбционном слое составляет 66 нм², что близко к посадочной площадке молекулы TW-80 в насыщенном монослое на границе вода–воздух [35]. Значения адсорбции БСА на полистироле превышают известные литературные данные, что связано с образованием полислоя белка на

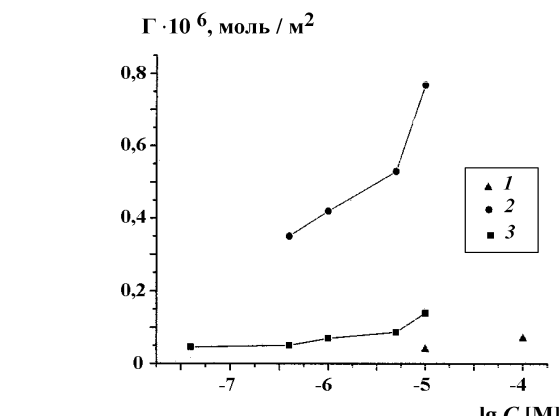


Рис. 1. Адсорбция TW-80 (1) и БСА (2) из водных растворов на полистироле

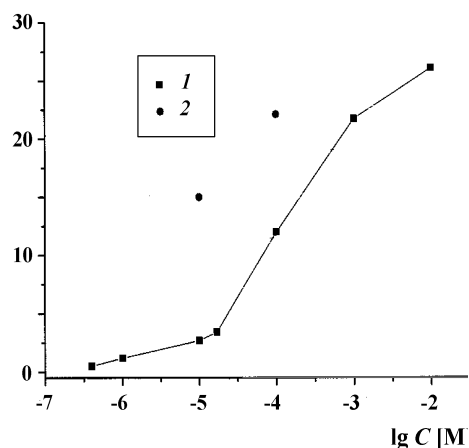


Рис. 2. Адсорбция БСА (1) и комплекса TW-80–БСА (2) из водных растворов на полистироле

поверхности [27]. После промывания в воде образцов, модифицированных белком, получены величины адсорбции, согласующиеся с литературными данными (рис. 2), так как на поверхности остается только первый слой белка, прочно связанный с поверхностью полистирола. Адсорбция комплекса возрастает при увеличении его концентрации (по мере увеличения концентрации TW-80 в смеси), причем более резко при $C_{\text{БСА}} = 10^{-4}$ М. По-видимому, адсорбция комплекса стимулирует соосаждение белка на поверхности при его избытке в смешанном растворе.

Расчеты величин $\sigma_{SW(W)}$ для исследованных поверхностей показывают, что модифицирование полистирола растворами БСА не обеспечивает достаточно низких (~ 3 мДж/м²) значений межфазной энергии (табл. 2). При модифицировании полистирола растворами TW-80 межфазная энергия $\sigma_{SW(W)} \approx (0,25-1,3)$ мДж/м², что означает диспергирование подложки в жидкую фазу и разрушение материала. Однако хорошие результаты получены для раство-

Таблица 1

Энергетические характеристики жидкостей, используемых для расчета $\sigma_{SW(W)}$

Жидкость	σ_L	σ_L^p	σ_L^d
Вода	72,6	50,8	21,8
Октан	21,8	–	21,8

Т а б л и ц а 2

Значения межфазной энергии поверхность–вода $\Gamma_{\text{SW}(w)}$.

Состояние поверхности	Краевые углы, град.			Межфазная энергия $\sigma_{\text{SW}(w)}$, мДж/м ²
	θ_a	θ_{VW}	θ_{OW}	
Немодифицированный полистирол	86	80	146	18,8
Модифицированный полистирол				
Модификатор				
БСА				
$C = 10^{-5}$ М	70	37	150	15,4
$C = 10^{-4}$ М	70	30	122	9,7
TW-80				
$C = 4 \times 10^{-7}$ М	60	70	148	0,25
$C = 3 \times 10^{-5}$ М	58	66	153	1,16
$C = 8 \times 10^{-5}$ М	52	65	163	1,3
$C = 1,1 \times 10^{-4}$ М	52	70	172	1,04
Комплекс БСА/TW-80*				
$C = 4 \times 10^{-8}$ М	63	40	155	8,8
$C = 5 \times 10^{-6}$ М	66	58	110	6,4
$C = 10^{-5}$ М	65	56	148	3,84
Комплекс БСА/TW-80**				
$C = 4 \times 10^{-7}$ М	61	53	150	5,9
$C = 10^{-5}$ М	62	58	134	2,4

* $C_{\text{БСА}} = 10^{-5}$ М; ** $C_{\text{БСА}} = 10^{-4}$ М.

ров с определенной концентрацией комплекса БСА–TW-80, что дает возможность использовать такие модифицирующие слои для обеспечения биосовместимости. Поверхности полистирола, модифицированные комплексом БСА–TW-80 состава 1:1 при концентрации $4 \cdot 10^{-7}$ – 10^{-5} М, имеют краевые углы натекания (θ_a), равные 53–58°, что соответствует вышеприведенным корреляционным данным, а следовательно, являются потенциально биосовместимыми материалами. Значения межфазной энергии поверхностей, уравновешенных с водой (2,4–6,4 мДж/м²), также отвечают критериальным значениям биосовместимых материалов, способных сохранять стабильность при контакте с биологическими средами. Интересно отметить, что свойства поверхности полистирола, модифицированной комплексами БСА–TW-80, мало зависят от состава и строения модифицирующего слоя. Аналогичный подход использован в работе [36] при исследовании влияния поверхностных свойств полиуретанов на их биосовместимость. Полярную и дисперсионную составляющие поверхностного натяжения и межфазную энергию рассчитывали по методике [37]. Однако авторы не выдерживали образцы полиуретанов в течение длительного времени в воде. Полученные оценки межфазной энергии пористых

мембран (1,14–0,10 мДж/м²) указывают на неустойчивость материала в водной среде при удовлетворительных оценках биосовместимости по ряду биологических тестов.

Близкие значения краевых углов и межфазной энергии для поверхностей полистирола, модифицированных комплексом БСА–TW-80, в системах с разными значениями $C_{\text{БСА}}$ в смешанном растворе подтверждают вывод об образовании комплекса состава 1:1, концентрация которого определяется концентрацией недостающего компонента TW-80 [31].

Следует отметить, что гистерезис краевых углов $\Delta\theta = \theta_a - \theta_{\text{VW}}$ минимален для поверхности полистирола ($\Delta\theta = 6^\circ$), а для его поверхности, модифицированной растворами комплекса, составляет 10°–12°, что связано с перестройкой структуры модифицирующих слоев на границе твердая поверхность–вода. Это подтверждается также изменением межфазной энергии при модифицировании поверхности комплексом БСА–TW-80 (от 8,8 до 2,4 мДж/м²). Низкие значения межфазной энергии при модифицировании поверхности TW-80 (от 1,3 до 0,25 мДж/м²) свидетельствуют о том, что неионогенное ПАВ является сильным модификатором поверхности полистирола, но модифицирующая пленка неустойчива при кон-

такте с водной средой. Весьма перспективными для модифицирования поверхностей полимеров могут быть плуроники, пленки которых устойчивы в воде [38]. Результаты модификации поверхности полистирола комплексами БСА–ТW-80, в результате которой на поверхности гидрофобного полимера од-

новременно присутствуют БСА и ТW-80, несущий оксизтильные цепочки, показывают принципиальную возможность улучшения биосовместимости материала и служат основой для проведения в дальнейшем биологических тестов, в частности адсорбции фибриногена на модифицированных образцах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полимеры в медицине / Под ред. Н.А. Платэ. М., 1969.
2. Платэ Н.А., Васильев А.Е. Физиологически активные полимеры. М., 1986.
3. Shtilman M.I. / Polymers for medico-biological use. VSP: Utrshet-Tokyo. 2000. Part I. P. 247.
4. Proteins at Interfaces I. / Ed. by J.L. Brash, T.A. Horbett. Physicochemical and Biochemical Studies, ACS Symposium Ser. 343 Amer.Chem. Soc. Washington, DC 1986.
5. Proteins at Interfaces II. / Ed. by T.A. Horbett, J.L. Brash. Fundamentals and Applications; ACS Symposium Ser., 602. Amer.Chem. Soc. Washington, DC 1995.
6. Feng J., Andrade D. // J. Coll. Int. Sci. 1996. **116**. P. 419.
7. Xu Z.K., Qu N. F.Q., Wan L.S., Wu J., Yao K. // Biomaterials. 2005. **26**. P. 589.
8. Fukumura H., Hayashi K., Yoshikawa S., Miya M., Yamamoto N., Yamashita I. // Biomaterials. 1987. **8**. P. 74.
9. Salzman E., Lindon J., McManama G., Ware J. // Ann. New-York Acad. Sci. 1987. **518**. P. 291.
10. West S.L., Salvage J.P., Lobb E.J., Armes S.P. et al. // Biomaterials. 2004. **25**. P. 1195.
11. Montargent B., Letourneur D. // Infect Control Hosp., Epidemiol. 2000. **21**. P. 404.
12. Kurian P., Kasibhata B., Daum J., Burns C.A., Moosa M., Rosenthal K.S., Kiennedy J.P. // Biomaterials. 2004. **24**. P. 3493.
13. Candy T., Sharma C.P. // J. Coll. Int. Sci. 1985. **108**. P. 105.
14. Hsu S.H., Tang C.M., Lin C.C. // Biomaterials. 2004. **25**. P. 5593.
15. Lim V.W.L., Kang E.T., Neoh K.G. // Synthetic Metals. 2001. **119**. P. 261.
16. Kim K., Kim C., Byun Y. // Biomaterials. 2004. **25**. P. 33.
17. Tsuji H., Satoh H., Ikeda S., Gotoh Y., Ishikawa J. // Nuclear Instruments and methods Phys. Res. B. 1998. **141**. P. 197.
18. Keogh J., Wolf M.F., Overend M.E., Tang L., Eaton J.W. // Biomaterials. 1987. **27**. P. 1996.
19. Torchilin V.P., Levchenko T.S., Whiteman K.R., Yaroslavov A.A et al. // Biomaterials 1999. **22**. P. 3035.
20. Gref R., Rodrigues J.S., Couvreur P. // Macromolecules. 2003. **35**. P. 9861.
21. Jiao Y., Ubrich N., Marchand-Arivier M., Vogneron C., Hoffman M. et al. // Circulation. 2003. **105**. P. 230.
22. Graf M., Muller A.H. // IUPAC Int. Symp. Ionic Polym., Cret., Prep. 2001. P. 12.
23. Fujiwara T., Miyamoto M., Kimura Y., Sakurai S. // Polymer. 2001. **42**. P. 1515.
24. Neradovich D., Soga O., Van Nostrum C.F., Hennik W.E. // Biomaterials. 2004. **25**. P. 2409.
25. Poly(ethylene glycol): chemistry and biological applications / Ed. by J.M. Harris, S. Zalipsky. Washington. DC ACS Symposium Ser. 1997.
26. Сумм Б.Д., Горюнов Ю.В. Физико-химические основы смачивания и растекания. М., 1976.
27. Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П., Сумм Б.Д. Поверхностные явления в белковых системах. Л., 1988.
28. Hader P., Grunze M., Dahint R., Whitesides G.M., Laibinis P.E. // J. Phys. Chem. B. 1998. **102**. P. 42.
29. Ruckenstein E., Lee S.H. // J. Coll. Int. Sci. 1987. **120**. N 1. P. 153.
30. Ямпольская Г.П., Задымова Н.М., Тарасевич Б.Н., Еленский А.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2004. **45**. № 6. С. 371.
31. Задымова Н.М., Ямпольская Г.П., Филатова Л.Ю. // Коллоид журн. 2006. **68**. № 2. С. 187.
32. Богданова Ю.Г., Должикова В.Д., Бадун Г.А., Сумм Б.Д. // Изв. РАН. Сер. химич. 2003. № 11. С. 2226.
33. Sauerbrey G. // Z. Phys. 1959. **155**. P. 206.
34. Адсорбция из растворов на поверхностях твердых тел / Под. ред. Г. Парфита, К. Рочестера. М., 1986.
35. Потешнинова М.В., Задымова Н.М., Григорьев Е.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2004. **45**. № 3. С. 195.
36. Lin D.T., Young T.H., Fang Y. // Biomaterials 2001. **22**. P. 1521.
37. Andrade J.D., Ma S.M., King R.N., Gregonis D.E. // J. Coll. Int. Sci. 1979. **72**. P. 488.
38. Li Z.F., Ruckenstein E. // J. Coll. Int. Sci. 2004. **62**. P. 269.

Поступила в редакцию 27.10.05

MODIFICATION OF THE POLYSTERENE SURFACE BY BSA/TWEEN-80 COMPLEX AND FORECAST OF BIOCOMPATIBILITY

G.P. Yampol'skaya, V.D. Dolzhikova

(Division of Colloid Chemistry)

Polystyrene surface was modified by the complex of Tween-80–BSA. Complex adsorption and a film formation have been established using piezoelectric weighing method.

State of modified surfaces was evaluated by contact angle measurements. Stability of modifying layers has been determined on the basis of critical values of interfacial energy after contacting of samples with water during 12 hours. Potential possibility is discussed for complex applications to enhance the biocompatibility of polymer materials.