

ПОЛУЧЕНИЕ ПОРИСТЫХ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ СОПОЛИУРЕТАНИМИДОВ И НАНОЧАСТИЦ ГРАФЕНА ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

© А. Л. Диденко, А. М. Камалов, М. А. Шишов, Н. В. Смирнова, К. А. Колбе, А. С. Нестерова, Г. В. Ваганов, В. Е. Юдин, В. В. Кудрявцев

Филиал НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ–ИВС,
199004, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В. О., д. 31
E-mail: vanilin72@yandex.ru

Поступила в Редакцию 25 декабря 2023 г.

После доработки 10 сентября 2024 г.

Принята к публикации 10 сентября 2024 г.

В условиях управляемой термодеструкции уретановых блоков в сополи(уретан-имиде), содержащем уретановые и имидные звенья в мольном соотношении 1:10 и допированном графеном (1.0 мас% от массы полимера), синтезированы пленки поли(оксидифенилен)пиромеллитимида с развитой пористой поверхностью. Полученные композитные пленки использованы в качестве субстратов (подложек) для культивирования на их поверхности дермальных фибробластов человека. Изучены механические, электрические и сорбционные свойства полученных композитов. С помощью метилтетразолиевого теста показано, что исследуемые материалы на основе полиимидов биосовместимы. Синтезированные в работе композитные пленки могут представить интерес в качестве плоских биоэлектродов.

Ключевые слова: полиимид; графен; органо-неорганический композит; механические свойства; электропроводность; фибробласты; МТТ-тест; клеточные технологии

DOI: 10.31857/S004446182404008X; EDN: WNVQDV

Полиимиды (ПИ) представляют собой промышленно значимый класс полимеров с имидными циклами в цепи. За счет изменения строения «диангидридных» и «диаминных» радикалов макромолекулы ПИ можно получать конструкционные материалы с различными эксплуатационными свойствами. Благодаря выявленной в последние годы биосовместимости ПИ [1] и их уникальным физико-механическим свойствам они могут использоваться в медицинской технике, например, при разработке сердечно-сосудистых катетеров, устройств для доставки стентов и систем доставки лекарств [1]. Одно из важных свойств ПИ — это возможность стерилизации изделий на их основе надежными методами (автоклавирувание при 300°C, радиационное облучение).

Свойства поверхности ПИ, как и другого полимерного материала, могут оказывать существенное влияние на его биологический ответ [2]. Повышенная клеточная адгезия обычно достигается в случае гидрофильных поверхностей, а гидрофобные поверхно-

сти поддерживают высокий уровень адсорбции белка. Однако повышенное влагопоглощение пленки может негативно сказываться на механических характеристиках ПИ в долгосрочной перспективе.

Известно, что большое влияние на пролиферацию фибробластов оказывают свободная поверхностная энергия полимерных пленок [3], их электропроводность [4], микрорельеф, а также механические свойства [5].

Следует отметить, что полимерным электропроводящим биоматериалам, содержащим углеродные наночастицы, в литературе уделяется заметное внимание [6, 7]. Однако исследования в области электропроводящих полиимидных композиций для биомедицинских приложений в литературе практически отсутствуют [8]. В последние годы в работах [9–11] получена и исследована электропроводящая композитная пленка на основе частично кристаллического термопластичного полиимида Р-ОДФО [Р — диангидрид 1,3-бис(3',4-дикарбоксифенокси)-

бензола, ОДФО — 4,4'-бис-(4"-аминофенокси)бифенил] и графена, которая перспективна в качестве биоэлектрода для электрической стимуляции фибробластов кожи человека. В связи с этим становятся актуальными вопросы целесообразности использования в обозначенном направлении более доступной поли(оксидифенилен)пиромеллитимидной пленки после модификации ее структуры в целях придания пористости и электропроводящих свойств. Такая модификация имеет практическое значение в случае, если при культивировании клеток на поверхности модифицированной пленки обеспечиваются показатели биосовместимости и биоактивности не ниже, чем были достигнуты ранее [9–11].

Для оценки пролиферативной активности клеток на тех или иных субстратах используются результаты колориметрического ММТ-теста (ММТ-тест — колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток) [12, 13]. В литературе имеются сведения о результатах МТТ-теста в случае культивации фибробластов на поверхности непористой пленки термопластичного полиимида Р-ОДФО, обработанной коронным разрядом [9–11].

В представленной работе предполагалось, что использование в качестве субстрата пористой композитной пленки поли(оксидифенилен)пиромеллитимида приведет к близким значениям МТТ-теста по сравнению с непористой пленкой Р-ОДФО, обработанной барьерным разрядом.

Цель работы — синтез пористой пленочной композиции поли(оксидифенилен)пиромеллитимида с графеном [путем управляемой термодеструкции предварительно полученного сополи(уретан-имида) (СПУИ)], изучение механических и электропроводящих свойств композита и оценка цитотоксичности пленки относительно дермальных фибробластов человека.

Экспериментальная часть

Исходные материалы. Выбранные в качестве объекта исследований образцы пористой пленки поли(оксидифенилен)пиромеллитимида были получены в результате термолиза в условиях первоначальных работ [14–16]. Исходные для проведения термолиза образцы СПУИ были наработаны по методикам, изложенным там же. При этом в качестве мономеров использовались пиромеллитовый диангидрид с температурой плавления (T_m) ~ 283–286°C (Sigma-Aldrich Co. LLC, кат. № 412287); поликапролактон с молекулярной массой $M_n = 2000$, $T_m \sim 50^\circ\text{C}$ (Sigma-Aldrich Co. LLC, кат. № 189421); 2,4-толуилендиизоцианат (ТДИ) с

$T_m \sim 20\text{--}22^\circ\text{C}$ (Sigma-Aldrich Co. LLC, кат. № Т39853); 4,4'-диаминодифениловый эфир с $T_m \sim 188\text{--}192^\circ\text{C}$ (Sigma-Aldrich Co. LLC, кат. № 516805). В качестве растворителя использовали N,N-диметилацетамид (Vecton Co. LLC, ос.ч. СОМР-3212, СТП ТУ КОМП 3-212–2010). В качестве наполнителя для приготовления композиции с поли(оксидифенилен)пиромеллитимидом использовался графен. Средний размер графеновых чешуек (мкм) 30–50, толщина графена (нм) 0.34–4.0, содержание углерода (мас%) $C > 99\%$, содержание функциональных групп (мас%) $0 < 1\%$ (ООО НПО «Графеновые материалы»). Для ММТ-теста использовались: DMEM — Dulbecco's Modified Eagle Medium (ООО НПП «ПанЭко», кат. № С425п), L-глутамин (Thermo Fisher Scientific, фирма Gibco, кат. № 25030024), антибиотик Penicillin Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, фирма Gibco, кат. № 15140122), фунгезон Amphotericin B (Thermo Fisher Scientific, фирма Gibco, кат. № 15290026), фетальная коровья сыворотка (Thermo Fisher Scientific, фирма Gibco, кат. № 10270106). В ходе процесса культивирования клеток применяли: 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ) (Thermo Fisher Scientific, кат. № М6494), DPBS [сухой буфер фосфатно-солевой Дюльбекко (DPBS), без Са и Mg, ООО НПП «ПанЭко», кат. № Р060п], ДМСО — диметилсульфоксид 99.80% х.ч. (ООО «НеваРеактив», СОМР-2451, СТП ТУ КОМП 2-451–2011). Физиологический раствор: натрия хлорид буфус 0.9%, код АТХ V07AB, рег. № ЛП-№ (002008)-(РГ-РУ) [АО производственная фармацевтическая компания Обновление (RENEWALtm)].

Приготовление полиамидокислотного преполимера сополи(уретан-имида) с повышенным содержанием имидных звеньев. В трехгорлую колбу, снабженную верхнеприводной мешалкой и трубкой для подачи и вывода аргона, загружали 5.0 г (2.5 ммоль) поликапролактандиола и 0.87 г (5.0 ммоль) толуилен-2,4-диизоцианата (ТДИ). Смесь на масляной бане нагревали до 80°C и выдерживали в течение 1 ч. Затем добавляли 1.1 г (5.0 ммоль) пиромеллитового диангидрида в виде тонкоизмельченного порошка. Смесь нагревали до 180°C и перемешивали в течение 2 ч до гомогенизации полученного расплава и прекращения выделения пузырьков образующегося в ходе реакции углекислого газа. Реакционную массу охлаждали до 160°C и в нее приливали 23 мл N,N-диметилацетамида для растворения образовавшегося продукта. Концентрация раствора по образованному макрономеру составляла 23 мас%. Макромномер из реакционного раствора не выделяли. Далее в колбу, содержащую приготовленный, как

описано выше, раствор макромономера, загружали 11.0 г (55.0 ммоль) 4,4'-диаминодифенилового эфира и 12.0 г (55.0 ммоль) пиромеллитового диангидрида и сразу же добавляли 50 мл N,N-диметилацетамида. После растворения мономеров реакцию смесь интенсивно перемешивали в течение 4 ч в токе аргона при комнатной температуре для завершения реакции полиацилирования диамина. Получали преполимер [сополи(уретан-амидокислоту)] в растворе N,N-диметилацетамида. Раствор с концентрацией 30 мас% по преполимеру пропускали через фильтр Шотта, обезгаживали в вакууме и затем готовили композицию с графеном.

Спектр ЯМР ^1H (ЯМР ^1H — протонный ядерный магнитный резонанс в отношении ядер водорода-1) преполимера (ДМСО- d_6) (ДМСО- d_6 — дейтерированный диметилсульфоксид) δ , м. д.: 9.91, 9.62, 9.12, 8.87, 8.38, 7.98–6.55, 3.99, 3.66, 2.29, 2.15, 2.11, 2.08, 1.54, 1.31.

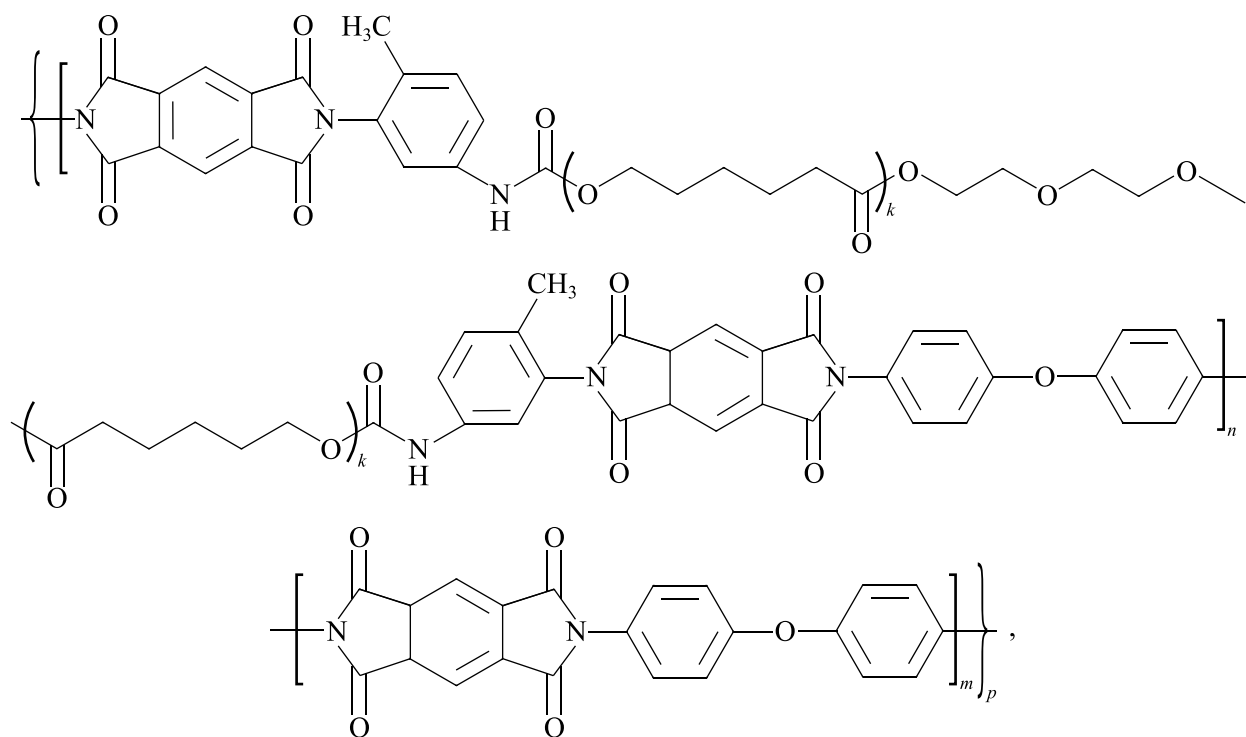
Характеристическая вязкость преполимера $[\eta] = 1.1 \cdot 100 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$.

Приготовление пленочной композиции полиамидокислотного преполимера сополи(уретан-имиды) с графеном. В заранее приготовленные растворы с

концентрацией 30 мас% преполимера [сополи(уретан-амидокислоты)] в N,N-диметилацетамиде вводили диспергированную в N,N-диметилацетамиде суспензию графена с таким расчетом, чтобы в итоговой композитной смеси содержание графена составило 1 мас%. После чего смесь перемешивали в течение 24 ч, затем подвергали диспергированию путем сонирования (обработкой ультразвуком — 24 кГц, ультразвуковая установка ИЛ100-6, ООО «Ультразвуковая техника-Инлаб») по 3 мин 5 раз с интервалами без обработки ультразвуком для охлаждения нагревающейся в процессе ультразвукового воздействия композиции до комнатной температуры.

Приготовление пленочной композиции сополи(уретан-имиды) с графеном путем имидизации преполимера. На гидрофобизированных стеклянных подложках методом полива были сформованы пленочные композиции СПУИ с графеном, которые в ходе ступенчатого прогрева высушивались (отверждались) и подвергались термической имидизации. Режим прогрева: 80°C — 12 ч, 100°C — 1 ч, 120°C — 1 ч, 140°C — 1 ч, 170°C — 2 ч.

Формула полученного СПУИ:



где $n = 1$, $m = 10$.

Приготовление образцов пористой полиимидной пленки в условиях термолиты пленочной композиции сополи(уретан-имиды) с графеном. Пленочные композиции СПУИ с графеном были подвергнуты тер-

молиту: пленки, прогретые при 170°C, были дополнительно прогреты на воздухе при 300 и 350°C от 5 до 60 мин. Дополнительно была получена термически имидизованная полиимидная пленка ПМ-ДАДФЭ (лабораторный образец) [9–11] путем конденсации

в растворе N,N-диметилацетамида, 4,4'-диаминодифенилового эфира и пиромеллитового ангидрида в эквимольных соотношениях. Режим термического прогрева: 80°C — 12 ч, 100°C — 1 ч, 200°C — 1 ч, 300°C — 1 ч, 360°C — 0.5 ч.

Методы исследования. Спектры ^1H ЯМР снимали в дейтерированном ДМСО (ДМСО- d_6) на ЯМР-спектрометре высокого разрешения AVANCE II-500 WB (Bruker) на рабочей частоте прибора 500 МГц при комнатной температуре. Диапазон измерений 1–10 м. д.

Механические характеристики пленок определяли при комнатной температуре в режиме одноосного растяжения на образцах в виде полос шириной 2 мм с длиной рабочей части 25 мм. Испытания проводили на универсальной разрывной машине Instron 5940 (Instron). Растяжение образцов пленок проводилось со скоростью 10 мм·мин $^{-1}$.

Измерения электрохимических характеристик проводили с использованием потенциостата-гальваностата Elns P40 на пленочных образцах, помещенных в тефлоновую ячейку и зажатых между двумя платиновыми плоскопараллельными электродами, расположенными на расстоянии 0.9 см друг от друга. Исследовали характеристики сухих пленок и пленок, помещенных в физиологический раствор (0.9% NaCl) при нормальных условиях (физиологический раствор состоял из натрия хлорида буфус 0.9 мас%).

Угол смачивания пленок СПУИ определяли методом сидячей капли с использованием прибора DSA30 (Kruss). Измерения проводили при комнатной температуре с использованием 17 мкл дистиллированной воды. Значения угла смачивания рассчитывали через 5 с после нанесения капли с использованием программного обеспечения DSA4. Значения были определены в 5 областях, случайным образом распределенных по поверхности.

МТТ-тест: в исследованиях *in vitro* использовали культуры фибробластов кожи человека, полученные из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в питательной среде из DMEM (DMEM — Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Paneco) с добавлением по отношению к культуральной среде: 1% L-глутамина, 1% антибиотиков (100 ед·мл $^{-1}$ пенициллина, 100 мкг·мл $^{-1}$ стрептомицина), 1% фунгизона (25 мкг·мл $^{-1}$ амфотерицина В) и 12%-ной фетальной коровьей сыворотки. Клетки культивировали в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO $_2$ при повышенной влажности (85%).

Образцы пленок стерилизовали в автоклаве в течение 40 мин при температуре 120°C и давлении 1.5 атм. Пленки нарезали на круглые фрагменты и по-

мещали в лунки 24-луночного культурального планшета; добавляли суспензию клеток ($25 \cdot 10^3$) в полной культуральной среде. Процесс заполнения планшета проводили в асептических условиях в ламинарном боксе. Для сравнения использовались клетки, выращенные на культуральном пластике (полистироле).

АСМ — атомно-силовая микроскопия, измерения проводили с использованием атомно-силового микроскопа Nanosurf FlexAFM (Nanosurf AG) в динамическом режиме с использованием кантилевера Tap150. Оверскан 20%. Для каждого образца проводилась съемка с полем 20×20 мкм и 1×1 мкм.

Оценку биосовместимости полученных пленок с живыми клетками проводили путем исследования пролиферативной активности дермальных фибробластов человека с помощью МТТ-теста. В основе этого теста лежит способность митохондриальных дегидрогеназ жизнеспособных и пролиферирующих клеток восстанавливать желтый тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) до нерастворимых в воде пурпурно-синих внутриклеточных кристаллов формазана. На 1-е и 4-е сутки культивирования в лунки 24-луночного культурального планшета (объем питательной среды 1 мл) добавляли 100 мкл рабочего раствора МТТ в концентрации 5 мг·мл $^{-1}$ в DPBS и инкубировали образцы 2 ч. Затем аккуратно удаляли среду, стараясь не задеть образовавшиеся кристаллы формазана. В каждую лунку добавляли по 1 мл ДМСО, получившийся раствор тщательно перемешали сеплером и инкубировали в течение 5 мин. После раствор перенесли в лунки 96-луночного культурального планшета. Каждый образец имел 9 повторов. Затем измеряли абсорбцию растворов с помощью планшетного спектрофотометра SPECTROstar Nano (BMG LABTECH). Оптическую плотность раствора формазана измеряли при длине волны 570 нм, для отсечения фонового сигнала — 690 нм. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения MARS Data Analysis Software, Microsoft Office Excel 16.

Обсуждение результатов

Пленки поли(оксидифенилен)пиромеллитимида с развитой пористой поверхностью были приготовлены в условиях управляемой термодеструкции уретановых блоков в СПУИ, содержащем уретановые и имидные звенья в мольном соотношении 1:10 и допированном графеном (1 мас% от массы полимера).

В табл. 1 представлены механические характеристики пленок СПУИ (после прогрева при 170 и

300°C) и композитов СПУИ с 1 мас% графена (после прогрева при 170 и 300°C).

Для полимерных систем, представляющих потенциальный интерес в качестве гибких электродов, имеют значимость деформационно-прочностные свойства образцов, содержащих графен пористых поли(оксидифенилен)пиромеллитимидных пленок (табл. 1).

Приведенные в табл. 1 данные позволяют сравнить механические свойства образцов полиимидных и СПУИ пленок и их композиций с графеном соответственно до и после термолиза уретановых блоков в СПУИ образцах. Исследовались образцы имидизованного при 170°C СПУИ (СПУИ-170°C); композиции имидизованного при 170°C СПУИ с 1 мас% графена (СПУИ-170°C + 1 мас% графена); термолизованного при 300°C пористого СПУИ (СПУИ-300°C); композиции термолизованного при 300°C пористого сополи(уретан-мида) с 1 мас% графена (СПУИ-300°C + 1 мас% графена). Как следует из данных табл. 1, все исследованные образцы характеризуются высоким уровнем механических свойств, соизмеримым с показателями непористой поли(оксидифенилен)пиромеллитимидной пленки (лабораторный образец), т. е. синтезированные образцы удовлетворяют требованиям к гибким полимерным электродам по критерию механических свойств [17–19].

Исследуемые в настоящей работе композитные пленки следует отнести к гибридным полимер-неорганическим композитам, состоящим из органической фазы (СПУИ или полиимида) и дисперсной минеральной фазы (наночастиц графена, образующих электропроводную перколяционную сетку) [20]. Для оценки возможности использования синтезированных в данной работе пленочных материалов в качестве электропроводящей матрицы, позволяющей проводить на ней электростимуляцию клеточных культур, требуется определить характеристики элект-

тропроводящих и электрохимических свойств этих материалов. Для исследования были выбраны следующие синтезированные образцы: композит СПУИ, имидизованный при температуре 170°C, с содержанием графена 1 мас% (СПУИ-170°C + 1 мас% графена); полиимид ПМ с содержанием графена 1 мас%, термолизованный при 300°C в течение 1 ч (СПУИ ПМ-300°C + 1 мас% графена); СПУИ с содержанием графена 1 мас%, термолизованный при 350°C в течение 1 ч (СПУИ-350°C + 1 мас% графена). В качестве объекта сравнения выбран известный в литературе образец пленочной композиции полиимида марки Р-ОДФО, содержащей 1 мас% графена (ПИ Р-ОДФО + 1 мас% графена), полученный нами ранее [9–11]. Отметим, что термин ПИ ПМ означает поли(оксидифенилен)пиромеллитимид.

Эксперимент по исследованию вольт-амперных характеристик образцов СПУИ проводился как на сухих пленках, так и на образцах, погруженных в физиологический раствор. Изучение материалов во влажной среде позволяло оценить электропроводность в условиях, близких к условиям электростимуляции клеток в культуральной среде [9]. На образцы подавался электрический потенциал пилообразной формы амплитудой ± 100 мВ с периодом смены потенциала 30 с. При этом регистрировался электрический ток, протекающий по образцу. Величина налагаемого потенциала и частота его циклирования выбраны с учетом физиологических параметров электростимуляции живых клеток и тканей [9].

На рис. 1, а, б приведены вольт-амперные характеристики исследованных полимерных образцов в диапазоне потенциалов ± 100 мВ, на рис. 1, б показаны вольт-амперные характеристики физиологического раствора (0.9%-ного водного раствора хлорида натрия).

Полиимиды — это диэлектрические материалы с сопротивлением выше 10^{15} Ом·м (рис. 1, а) [9], а

Таблица 1
Механические свойства пленок СПУИ и композитов на их основе

Образец	Свойства пленок		
	модуль Юнга E , МПа	модуль упругости при растяжении σ_p , МПа	относительное удлинение при растяжении ϵ_p , %
СПУИ-170°C	1796 ± 229	113 ± 8	172 ± 15
СПУИ-170°C+1% графена	1820 ± 68	99 ± 8	82 ± 11
СПУИ-300°C	1494 ± 96	103 ± 11	106 ± 12
СПУИ-300°C+1% графена	1880 ± 67	78 ± 8	43 ± 7
ПМ-ДАДФЭ лабораторный образец	2115 ± 226	122 ± 10	34 ± 4

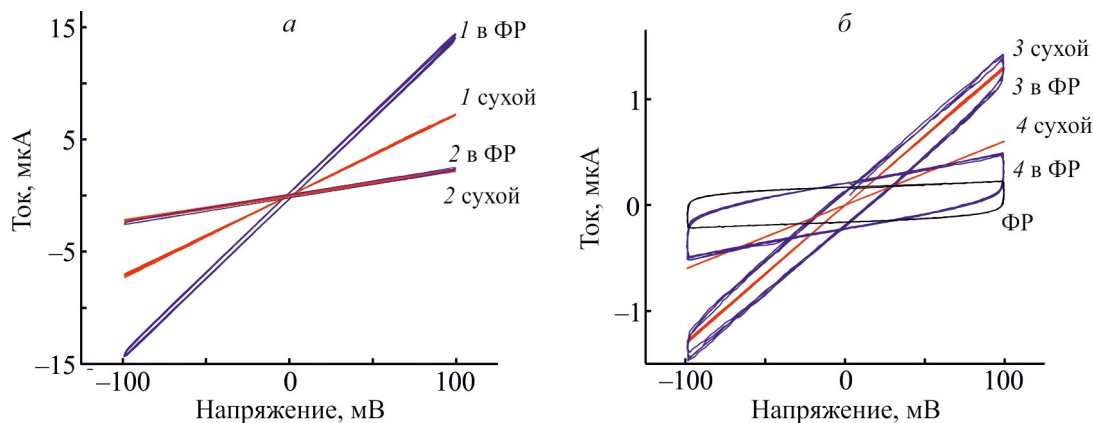


Рис. 1. Вольт-амперные характеристики сухих образцов (обозначены красным цветом), образцов, смоченных физиологическим раствором (обозначены синим цветом), и физиологического раствора (обозначены черным цветом). а) 1 — полиимид Р-ОДФО [9–11] + 1 мас% графена, 2 — сополи(уретан-имид-170°C + 1 мас% графена; б) 3 — сополи(уретан-имид)-300°C + 1 мас% графена, 4 — сополи(уретан-имид)-350°C + 1 мас% графена.

СПУИ имеют сопротивление порядка 10^{12} Ом·м. Добавление графена в данные структуры приводит к снижению сопротивления, что свидетельствует о наличии в образце перколяционной сетки графена. На рис. 1 красным цветом представлены вольт-амперные характеристики для сухих образцов графенсодержащих полимеров. Линейность представленных зависимостей свидетельствует об исключительно электронном характере проводимости образцов. Электропроводность образцов коррелирует с углом наклона кривых вольт-амперных зависимостей и соответствует различной степени электрической перколяции проводящей компоненты (графена). Среди исследованных образцов самая высокая проводимость наблюдается в случае композиции на основе кристаллизующегося полиимида Р-ОДФО (рис. 1, а, кривая 1). Разумно полагать, что наличие гибких полиуретановых блоков в структуре СПУИ нарушает перколяцию слоев графена в объеме сополимера и, как следствие, обуславливает уменьшение проводимости образца (рис. 1, а, кривая 2). Весьма вероятно, что термолиз пленки СПУИ, приводящий к удалению полиуретановых блоков из объема полимера и обуславливающий образование пористой полиимидной пленки-мембраны [14, 15] с «разрыхленной» внутренней структурой, обуславливает снижение перколяции и уменьшение проводимости образца. Наименьшая проводимость наблюдается в случае полиимида, полученного в результате термолиза исходной сополи(уретан-имидной) композиции (рис. 1, кривые 1, 2). Следует отметить, что выбор в качестве объекта сравнения графенсодержащей композиции термопластичного полиимида Р-ОДФО [9] не совсем корректен вследствие различий в химической

структуре этого полиимида с ПМ, а также формирования композиции с применением коронного разряда, однако является вынужденным ввиду отсутствия в литературе соответствующих данных, относящихся к иным полиимидам.

При исследовании образцов пленок в физиологическом растворе (рис. 1) проявляются те же факторы изменения электропроводности, что и при исследовании пленок в сухом состоянии. Важно отметить, что в случае композиций с графеном термолизованных полиимидов электронная проводимость материалов становится сопоставимой с ионной проводимостью ячейки (рис. 1, б, кривые 3, 4). По этой причине линейные вольт-амперные зависимости преобразуются

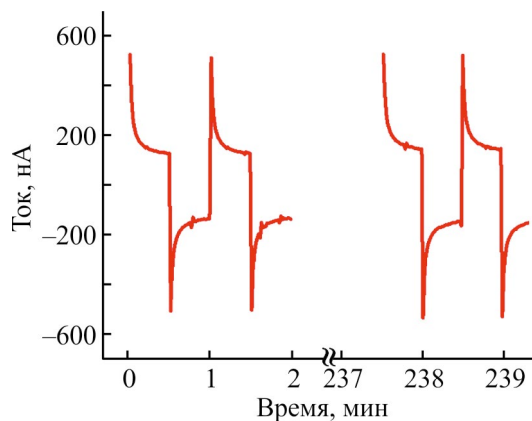


Рис. 2. Развертка токов во времени для образца композиции сополи(уретан-имида), содержащего 1 мас% графена, термолизованного при 300°C.

Показаны величины токов в первые минуты измерений и спустя 4 ч непрерывного циклирования потенциалом ± 100 мВ П-образной формы.

в циклические вольт-амперограммы, характерные для ион-проводящего физиологического раствора (рис. 1, б).

Интересной особенностью является рост электропроводности образцов композиций исследованного СПУИ и полиимида Р-ОДФО при смачивании физиологическим раствором (рис. 1, кривые 1, 2). Из графика видно, что проводимость увеличивается почти в 2 раза в случае композиции полиимида Р-ОДФО (рис. 1, кривая 1). Предположительно, набухание пленки приводит к улучшению условий перколяции, вызывая более плотное прижатие слоев графена. Нельзя исключить также и возможность встраивания в структуру пленки ионов из физиологического раствора с образованием дополнительных электропроводящих мостиков между соседними слоями графена.

На рис. 2 показана временная развертка циклов перезарядки пленки (матрицы) на примере образца композиции СПУИ, термолизованной при 300°C и содержащей 1 мас% графена, в диапазоне потенциалов ± 100 мВ. Видно, что в ходе непрерывного циклирования на протяжении 4 ч токи, протекающие через образец, остаются неизменными, что говорит о стабильности полимерной матрицы в данных условиях. Таким образом, матрица пригодна для проведения продолжительной электростимуляции клеточных культур.

Таблица 2

Угол смачивания поверхности исследованных пленок полярной жидкостью

Образец	Угол смачивания, град
СПУИ-170°C	57 ± 5
СПУИ-170°C + 1% графена	60 ± 5
ПИ-300°C	62 ± 6
ПИ-300°C + 1% графена	63 ± 6
ПИ ПМ-ДАДФЭ лабораторный образец	65 ± 4

Величины угла смачивания исследуемых пленок представлены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, угол смачивания полученных материалов находится в диапазоне 57° – 63° . Известно, что оптимальный угол смачивания воды с поверхностью пленки для адгезии клеток составляет примерно 70° [21], но для лучшего прикрепления клеток поверхность должна иметь развитый микро-рельеф [10].

АСМ-изображения фрагментов верхней (свободной) поверхности сополимера и его композитов (матрица сканирования 1×1 мкм), полученных на разных стадиях прогрева образца от 170 до 300°C, представлены на рис. 3. Видно, что шероховатость у

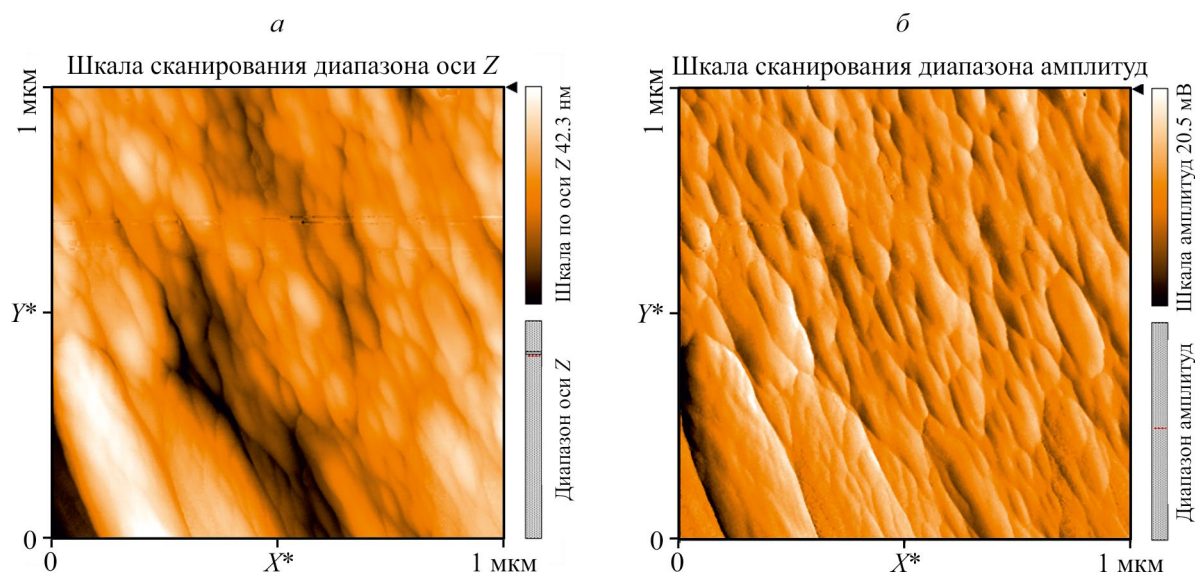


Рис. 3. Микрофотографии атомно-силовой микроскопии свободной поверхности пленок сополимера и его композитов на разных стадиях прогрева.

В режиме топографии (а) сополи(уретан-имид)-170°C, (б) сополи(уретан-имид)-170°C + 1 мас% графена, (в) сополи(уретан-имид)-300°C, (г) сополи(уретан-имид)-300°C + 1 мас% графена; в режиме амплитуды (б) сополи(уретан-имид)-170°C, (в) сополи(уретан-имид)-170°C + 1 мас% графена, (д) сополи(уретан-имид)-300°C, (е) сополи(уретан-имид)-300°C + 1 мас% графена; площадь сканирования 1×1 мкм.

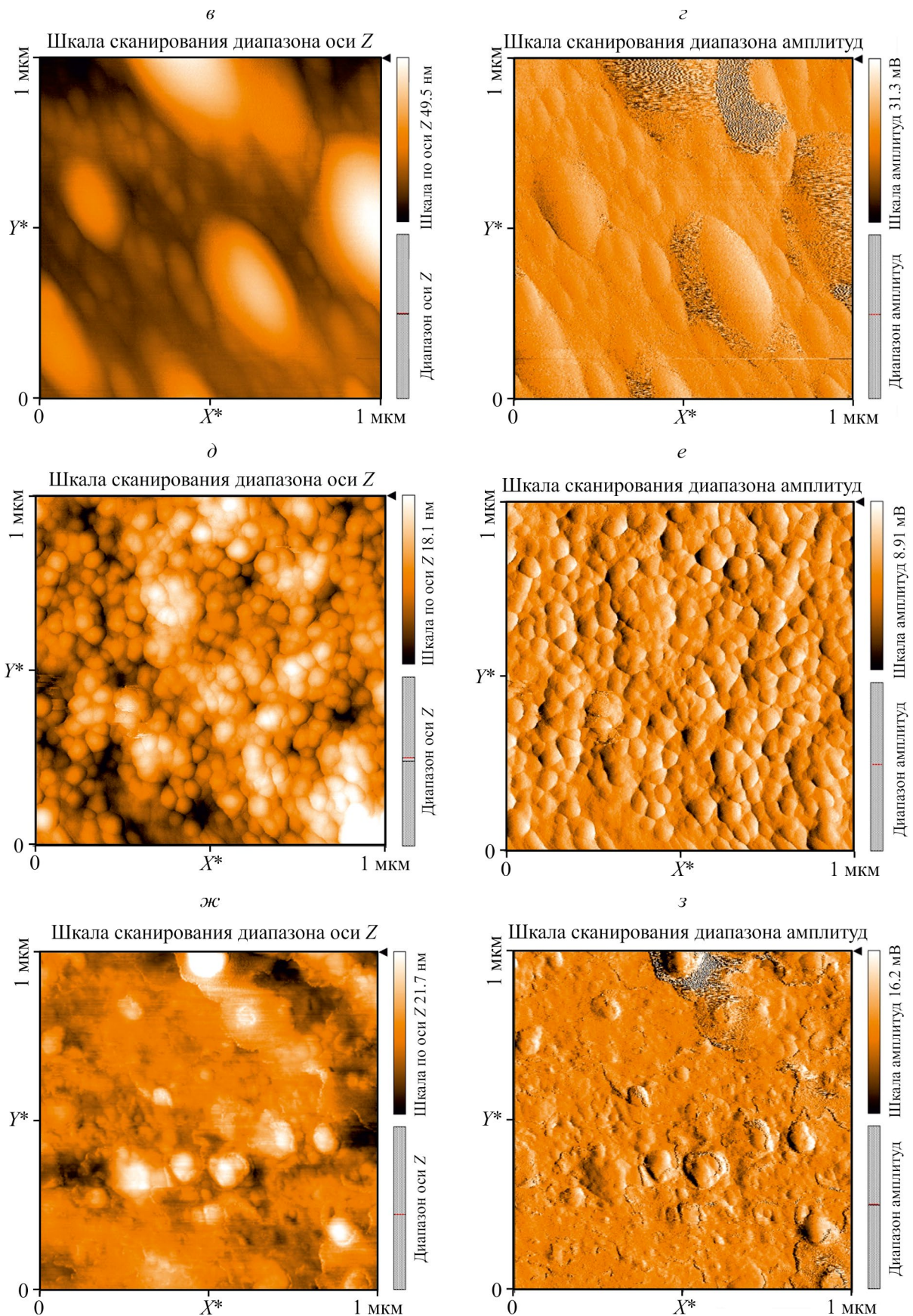


Рис. 3. Продолжение.

наполненных образцов выражена слабее. На АСМ-изображениях тонкой структуры поверхности пленки, нагретой при 170 и 300°C (матрица сканирования 1 × 1 мкм), отчетливо видна мелкозернистая морфология. Между зернами видны небольшие зазоры, и они локализованы в приповерхностном слое пленки. Видны каверны. Поверхность достаточно гладкая. Как видно, изменение высоты геометрии поверхности у наполненных образцов выражено сильнее. Поверхность ненаполненного образца, нагретого до 300°C, сильно текстурирована и имеет более развитый рельеф, чем у всех остальных образцов. Изменение высоты рельефа варьируется в пределах 1–2 мкм. Пленки, нагретые до 300°C, имеют доменную морфологию с удлиненными эллиптическими образованиями, плотно прилегающими друг к другу на поверхности. Такое морфологическое устройство свидетельствует о пористой структуре полученных пленок и их композитов, причем, по данным морфологического анализа, пористость ненаполненных образцов выражена сильнее, о чем свидетельствует также наша предыдущая работа [15]. Видно, что морфология поверхности пленок и их композитов исследованных сополимерных образцов становится более выраженной в результате термического разрушения блоков поликапролактона и приобретает доменную структуру. Анализируя структуры на АСМ микрофотографиях и сравнивая со значениями полученных величин угла смачивания, можно сделать вывод о том, что у наполненных образцов гидрофобность немного выше, чем у ненаполненных, однако это не является критичным фактором, который бы не позволил использовать эти полимеры в качестве подложек, способных проводить электрический ток. В дальнейшем полученные сополимеры и их композиты были исследованы на предмет биосовместимости с клеточными культурами.

Стандартным методом оценки жизнеспособности животных клеток на поверхности полимерных субстратов (подложек) является МТТ-тест, который заключается в определении митохондриальной активности клеток [9]. В результате восстановления образуется нерастворимый в водной среде формазан, количество которого коррелирует с количеством жизнеспособных клеток. Формазан переводят в раствор с помощью диметилсульфоксида и его концентрацию определяют оптическим методом с помощью спектрофотометра, поскольку раствор формазана поглощает свет на длине волны около 570 нм.

В представленной работе дермальные фибробласты человека выращивались на субстратах (поверхностях): СПУИ, имидизованного при 170°C

(СПУИ-170°C); композиции СПУИ, имидизованной при 170°C и содержащей 1 мас% графена (СПУИ-170°C + 1 мас% графена); полиимида, термолизованного при 300°C (СПУИ-300°C); композиции полиимида, термолизованной при 300°C и содержащей 1 мас% графена (СПУИ-300°C + 1 мас% графена). МТТ-тесты проводили после первых и четырех завершающих суток культивирования клеток на поверхности исследованных субстратов. Результаты МТТ-тестов представлены на рис. 4.

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение в композиты графена приводит к небольшому снижению значений показателей МТТ-тестов, в случае полиимидных образцов соответствующие показатели выше, чем у сополи(уретан-имидных) (табл. 2). Это обстоятельство не может быть связано с цитотоксическим действием графена и, вероятно, объясняется изменением структуры поверхности композитных пленок и влиянием этих изменений на клеточную адгезию. Представленные данные (рис. 4) свидетельствуют о том, что всем исследованным композитным пленкам соответствуют высокие значения оптической плотности растворов формазана при 570 нм, т. е. по результатам МТТ-тестов материалы являются биосовместимыми и в сочетании с данными по их электропроводности могут быть использованы для электрической стимуляции клеток

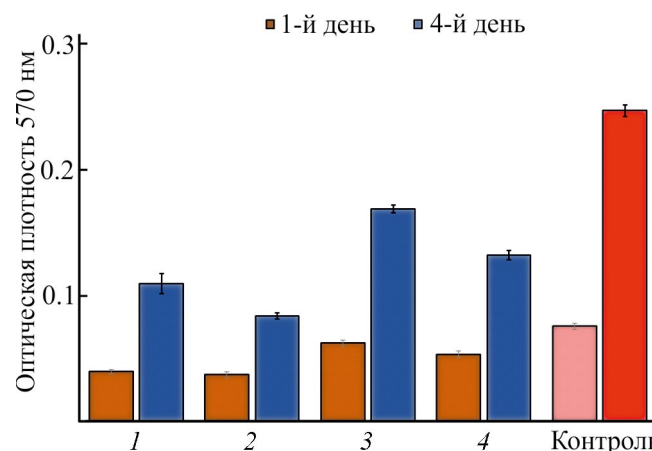


Рис. 4. Диаграмма метилтетразолиевых тестов по результатам культивирования дермальных фибробластов человека в течение 1 (левый столбец каждого образца) и 4 сут (правый столбец каждого образца) на поверхностях субстратов.

1 — сополи(уретан-имид)-170°C, 2 — сополи(уретан-имид)-170°C + 1 мас% графена, 3 — сополи(уретан-имид)-300°C, 4 — сополи(уретан-имид)-300°C + 1 мас% графена и контрольный образец (культуральный пластик полистирол).

при решении задач клеточных и регенеративных технологий. Таким образом, полученные наполненные сополимеры могут быть в дальнейшем использованы в качестве материалов для целенаправленного электрического воздействия на клеточный субстрат для стимуляции его роста.

Выводы

В ходе селективной деструкции уретановых звеньев термолизом в наполненном графеном сополимере получены полиимидные пленки с пористой поверхностной структурой. Отношения уретановых блоков к имидным составляло в мольном соотношении 1 к 10. Масса введенного графена составляла 1% от общей массы сополимера. Показано, что синтезированные образцы по критерию механических свойств удовлетворяют требованиям к гибким полимерным электродам. Параметры вольт-амперных характеристик синтезированных гибридных образцов отвечают критерию требований, предъявляемых к полимерным материалам для биоэлектродов. Из результатов проведенных метилтетразолиевых тестов с использованием дермальных фибробластов следует, что разработанные гибридные пленки являются биосовместимыми и в сочетании с данными по электропроводности пленок могут быть использованы для электрической стимуляции клеток при решении задач клеточных и регенеративных технологий. При этом показано, что топографические особенности пленок, а также механические и электрические свойства внеклеточных материалов могут оказывать влияние на адгезию и пролиферацию фибробластов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Финансирование работы

Работа выполнена по теме НИР госзадания «Полимерные и композиционные материалы для перспективных технологий». Регистрационный номер проекта 124013000726-6.

Информация о вкладе авторов

А. Л. Диденко участвовал в постановке задачи исследования и интерпретации его результатов, отвечал за общее планирование исследования и координацию работы всех участников, в соответствии

с заданной архитектурой полимеров предложил и опробовал модифицированные методики синтеза полимеров и формования из них пленочных образцов, принимал лидирующее участие в написании статьи; М. А. Шишов провел инструментальное исследование характеристик электропроводящих и электрохимических свойств сополи(уретан-имидных) и полиимидных материалов по специально разработанной им методике, интерпретировал полученные результаты, написал соответствующую часть статьи; А. С. Нестерова провела синтез полимеров, подготовила образцы пленок полимеров для исследования электрофизическими и биологическими методами, участвовала в обсуждении полученных результатов, принимала участие в написании соответствующей части статьи; А. М. Камалов выполнил обзор литературы по теме статьи, интерпретировал полученные результаты, принимал участие в написании соответствующей физической части статьи; Г. В. Ваганов провел механические испытания полимерных пленок, интерпретировал полученные результаты, принимал участие в написании соответствующей части статьи; Н. В. Смирнова провела анализ результатов МТТ-тестов исследованных пленок, интерпретировала полученные результаты, принимала участие в написании соответствующей части статьи; К. А. Колбе выполнил МТТ-тесты синтезированных полимеров, интерпретировал полученные результаты, принимал участие в написании соответствующей части статьи; В. Е. Юдин суммировал результаты участников исследования, обеспечив целостный характер исследования, участвовал в постановке задачи исследования, написании статьи; В. В. Кудрявцев обосновал концепцию исследования, участвовал в постановке цели и задачи исследования, интерпретации результатов на всех этапах исследования, принимал участие в написании статьи, провел редактирование статьи. Все соавторы принимали активное участие в обсуждении полученных результатов и формулировке выводов по работе.

Информация об авторах

Диденко Андрей Леонидович, к.х.н., с.н.с., филиал НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ–ИВС
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4285-7734>

Шишов Михаил Александрович, к.т.н., с.н.с., филиал НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ–ИВС
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5100-2565>

Камалов Алмаз Маратович, к.т.н., с.н.с., филиал НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ–ИВС
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2044-957X>

Смирнова Наталья Владимировна, к.б.н., с.н.с., филиал НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ–ИВС

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5524-2785>

Колбе Константин Андреевич, м.н.с., филиал НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ–ИВС

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2304-1759>

Нестерова Анна Сергеевна, м.н.с., филиал НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ–ИВС

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5100-5357>

Ваганов Глеб Вячеславович, к.т.н., с.н.с., филиал НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ–ИВС

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5834-7456>

Юдин Владимир Евгеньевич, д.ф.-м.н., г.н.с., филиал НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ–ИВС

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5517-4767>

Кудрявцев Владислав Владимирович, д.х.н., проф., г.н.с., филиал НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ–ИВС

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7392-4659>

Список литературы

- [1] Constantin C. P., Aflori M., Damian R. F., Rusu R. D. Biocompatibility of polyimides: A mini-review // *Materials*. 2019. 12. P. 3166. <https://doi.org/10.3390/ma12193166>
- [2] Bernard M., Jubeli E., Pungente M. D., Yagoubi N. Biocompatibility of polymer-based biomaterials and medical devices — Regulations, *in vitro* screening and risk-management // *Biomater. Sci*. 2018. 6. P. 2025–2053. <https://doi.org/10.1039/c8bm00518d>
- [3] Alexander M. R., Williams P. Water contact angle is not a good predictor of biological responses to materials // *Biointerphases*. 2017. V. 12. N 2. P. 02C201 (1–6). <https://doi.org/10.1116/1.4989843>
- [4] Kamalov A., Dresvyanina E., Borisova M., Smirnova N., Kolbe K., Yudin V. The effect of electrical conductivity of films based on chitosan and chitin on the bioactivity of human dermal fibroblasts // *Mater. Today Proc*. 2020. V. 30. Part 3. P. 798–801. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.02.346>
- [5] Smirnova N. V., Kolbe K. A., Dresvyanina E. N., Dobrovolskaya I. P., Yudin V. E. Optimization of mechanical properties and bioactivity of composite matrices based on chitosan and chitin nanofibril for tissue engineering // *Cell Tissue Biology*. 2019. V. 13. P. 382–387. <https://doi.org/10.1134/S1990519X19050067>
- [6] Yu R., Zhang H., Guo B. Conductive biomaterials as bioactive wound dressing for wound healing and skin tissue engineering // *Nano-Micro Lett*. 2022. V. 14. N 1. P. 2–46. <https://doi.org/10.1007/s40820-021-00751-y>
- [7] Колбе К. А., Шишов М. А., Сапурина И. Ю., Смирнова Н. В., Кодолова-Чухонцева В. В., Дресвянина Е. Н., Камалов А. М., Юдин В. Е. Электростимуляция дермальных фибробластов человека на электропроводящей матрице // *ЖТФ*. 2022. Т. 91. № 12. С. 2059–2066. <https://doi.org/10.21883/JTF.2021.12.51772.160-21> [Kolbe K. A., Shishov M. A., Sapurina I. Yu., Smirnova N. V., Kodolova-Chukhontseva V. V., Dresvyanina E. N., Kamalov A. M., Yudin V. E. Electrical stimulation of human dermal fibroblasts on conducting matrix // *Techn. Phys*. 2022. V. 67. N 15. P. 2466–2472. <https://doi.org/10.21883/TP.2022.15.55275.160-21>].
- [8] Kaur G., Adhikari R., Cass P., Bown M., Gunatillake P. Electrically conductive polymers and composites for biomedical applications // *Royal Soc. Chem. Advances*. 2015. V. 5. N 43. P. 37553–37567. <https://doi.org/10.1039/C5RA01851J>
- [9] Kamalov A., Shishov M., Smirnova N., Kodolova-Chukhontseva V., Dobrovolskaya I., Kolbe K., Didenko A., Ivan'kova E., Yudin V., Morganti P. Influence of electric field on proliferation activity of human dermal fibroblasts // *J. Functional Biomater*. 2022. V. 13. N 3. P. 89–104. <https://doi.org/10.3390/jfb13030089>
- [10] Kamalov A., Smirnova N., Kolbe K., Borisova M., Bystrov S., Didenko A., Vlasova E., Yudin V. Activation of R-BAPB polyimide with cold plasma dielectric barrier discharge for improvement of cell-material interaction // *J. Appl. Polym. Sci*. 2022. V. 139. N 42. P. 1–9 (e53024). <https://doi.org/10.1002/app.53024>
- [11] Kamalov A. M., Celujko K. S., Kolbe K. A., Smirnova N. V., Borisova M. E., Bondarenko P. N., Vaganov G. V., Didenko A. L., Yudin V. E. Surface modification of polyimide film in the barrier discharge for cellular technologies // *J. Phys.: Conf. Ser*. 2021. V. 2103. N 012051. P. 1–5. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2103/1/012051>
- [12] Прилепский А. Ю., Дроздов А. С., Богатырев В. А., Староверов С. А. Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности наноматериалов. СПб: Ун-т ИТМО, 2019. С. 1–43.
- [13] Ghasemi M., Turnbull T., Sebastian S., Kempson I. The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. V. 22. N 23. P. 12827–12856. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- [14] Didenko A. L., Ivanov A. G., Smirnova V. E., Vaganov G. V., Anokhina T. S., Borisov I. L., Volkov V. V., Volkov A. V., Kudryavtsev V. V. Selective destruction of soluble polyurethaneimide as novel approach for fabrication of insoluble polyimide films // *Polymers*. 2022. V. 14. N 19. P. 4130–4145. <https://doi.org/10.3390/polym14194130>

- [15] Sukhanova T. E., Didenko A. L., Borisov I. L., Anokhina T. S., Ivanov A. G., Nesterova A. S., Kobukhno I. A., Yushkin A. A., Kudryavtsev V. V., Volkov A. V. Morphological analysis of poly(4,4'-oxydiphenylene-pyromellitimide)-based organic solvent nanofiltration membranes formed by the solution method // *Membranes*. 2022. V. 12. N 12. P. 1235–1246. <https://doi.org/10.3390/membranes12121235>
- [16] Диденко А. Л., Нестерова А. С., Камалов А. М., Попова Е. Н., Ваганов Г. В., Кобыхно И. А., Мамаев Н. Н., Анохина Т. С., Борисов И. Л., Кудрявцев В. В. Селективная деструкция в растворах щелочи имидных и уретановых блоков в термолизованных образцах пленок сополи(уретан-имидов) // *Пласт. массы*. 2023. № 11–12. С. 6–9. <https://doi.org/10.35164/0554-2901-2023-11-12-6-9>
- [17] Chitrakar C., Hedrick E., Adegoke L., Ecker M. Flexible and stretchable bioelectronics // *Materials*. 2022. V. 15. N 5. P. 1664. <https://doi.org/10.3390/ma15051664>
<https://www.mdpi.com/1996-1944/15/5/1664>
- [18] Durable miniaturized bioelectronics // *Nature Biomed. Eng.* 2017. 1. Article number: 0053. <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0053>
- [19] Saliterman S. S. Fundamentals of bioMEMS and medical microdevices // Book. 2006. ISBN: 9780819459770. Volume: PM153. P. 608.
- [20] Герасин В. А., Антипов Е. М., Карбушев В. В., Куличихин В. Г., Карпачева Г. П., Тальрозе Р. В., Кудрявцев Я. В. Новые подходы к созданию гибридных полимерных нанокompозитов: от конструкционных материалов к высокотехнологичным применениям // *Успехи химии*. 2013. Т. 82 (4). С. 303–332. <https://doi.org/10.1070/RC2013v082n04ABEH004322> [Gerasin V. A., Antipov E. M., Karbushev V. V., Kulichikhin V. G., Karpacheva G. P., Talroze R. V., Kudryavtsev Ya. V. New approaches to the development of hybrid nanocomposites: From structural materials to high-tech applications // *Russ. Chem. Rev.* 2013. V. 82 (4). P. 303–332. <https://doi.org/10.1070/RC2013v082n04ABEH004322>].
- [21] Tamada Yasushi, Yoshito Ikada. Cell adhesion to plasma-treated polymer surfaces. // *Polymer*. 1993. V. 34. N 10. P. 2208–2212. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(93\)90752-v](https://doi.org/10.1016/0032-3861(93)90752-v)