

OBDELAVA POLIMERNIH PODLAG Z NIZKOTLAČNO KISIKOVO PLAZMO ZA BOLJŠO VEZAVO MALIGNIH ČLOVEŠKIH KOSTNIH CELIC

Nina Recek, Miran Mozetič, Alenka Vesel

ZNANSTVENI ČLANEK

Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39, 1000 Ljubljana

POVZETEK

Vakuumske tehnologije si postopoma utirajo pot v biologiji in medicini. Sodobni tehnološki postopek za obdelavo podlag, na katerih se razraščajo biološke celice, je obdelava z nizkotlačno plinsko plazmo. V prispevku opisujemo vpliv plazemske obdelave polimera PET (polietilen tetraftalat), ki ga uporabljamo kot podlago za razraščanje malignih človeških kostnih celic. Že kratkotrajna obdelava povzroči spremembo površinskih lastnosti polimera, kar vodi k bistvenemu izboljšanju vitalnosti tovrstnih celic. Začetno fazo razraščanja smo opazovali z elektronsko mikroskopijo. Ugotovili smo, da maligne kostne celice že v kratkem času tvorijo nitaste (fibrilne) strukture na podlagah, obdelanih s kisikovo plazmo, medtem ko tega pojava nismo opazili na neobdelanih podlagah. Tovrstni eksperimenti so prvi korak k selektivni vezavi rakastih celic na plazemsko obdelanih materialih.

Ključne besede: biološke celice, nizkotlačna plinska plazma, PET-polimer

Modification of polymer surfaces with low-pressure oxygen plasma for better adhesion of human osteosarcoma cells

ABSTRACT

Vacuum technologies are nowadays commonly used in the fields of biology and medicine. One of such technologies is a process for modification of polymer surfaces with low-pressure gas plasma. In this contribution we describe the effect of plasma surface modification on PET polymer that is used as a surface for proliferation of osteosarcoma cells. Already short treatment time with oxygen plasma has an effect on polymer surface properties, which consequently leads to better adhesion and proliferation of these cells. The first step of proliferation of osteosarcoma cells was observed using the scanning electron microscopy (SEM). We observed that osteosarcoma cells started to build fibrous structures on the polymer surfaces modified with oxygen plasma, however we did not observe that phenomena on untreated polymer surfaces. These are preliminary results that have an important contribution to selective adhesion of cancer cells on plasma-treated polymer surfaces.

Keywords: biological cells, low pressure gas plasma, PET polymer

1 UVOD

Termodinamsko neravnovesna stanja plinov so se popolnoma uveljavila kot medij za površinsko modifikacijo različnih vrst trdnih materialov [1–5]. Bistvena prednost tovrstnega stanja plinov pred ravnovesnim je v izredno visoki kemijski reaktivnosti plina že pri sobni temperaturi. To dejstvo lahko izkoristimo predvsem za modifikacijo površinskih lastnosti materialov [16], ki ne prenesejo segrevanja do visokih temperatur [6–13]. Neravnovesno stanje plina je mogoče doseči z različnimi tehnikami,

najpomembnejša pa je prehod plina skozi nizkotlačno razelektritev.

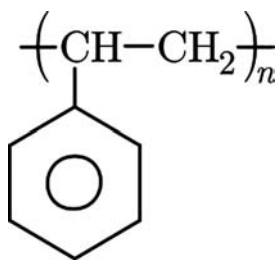
V plinski razelektritvi so prosti elektroni, ki se v električnem polju pospešujejo do kinetične energije, ki ustreza temperaturi več 10 000 K. Elektroni s tako visoko temperaturo lahko dajo del svoje kinetične energije molekulam plina in jih s tem vzbudijo, disociirajo ali ionizirajo. Zaradi izredno majhnega razmerja med maso elektronov in plinskih molekul elektroni ne morejo dajati znatnega dela svoje kinetične energije molekulam, zato ostane plin hladen. V nizkotlačni plazmi imamo tako sočasno vroče elektrone in hladne molekule, ki se navadno nahajajo v vzbujenih stanjih. Ob dotiku plazme s površino trdnih snovi molekule v vzbujenih stanjih kemijsko reagirajo z atomi na površini trdne snovi, ne da bi jo segrevali. Vroči elektroni prav tako zanemarljivo segrevajo trdno snov zaradi svoje majhne mase in s tem zanemarljive toplotne kapacitete. Tovrstno stanje plina navadno imenujemo neravnovesna plinska plazma.

Plazmo lahko vzbujamo v katerih koli plinih ali plinskih mešanica. Za obdelavo površine polimernih materialov je še posebej zanimiva kisikova plazma [14, 15]. Notranje molekule kisika se ob neprožnih trkih z elektroni vzbujajo v stanja, ki so metastabilna. Zaradi izredno velike trajnostne dobe obeh metastabilnih stanj se lahko nevtralne molekule kisika disociirajo ob naslednjem trku s prostimi elektroni. Posledica navedene stopenjske disociacije je izredno velika stopnja disociiranosti kisikovih molekul že pri razmeroma nizki temperaturi in gostoti elektronov. Že pri majhnih močeh plinske razelektritve lahko zaradi tega zlahka dosežemo stopnjo disociiranosti reda velikosti 10 %. Tako visoko disociiranost bi v ravnovesnem stanju plina dosegli šele pri temperaturi okoli 100 000 K.

Kisikovi atomi so kemijsko izredno reaktivni, tako da reagirajo s polimernimi materiali že pri sobni temperaturi. Na površini polimera tako nastane izredno tanka plast, ki je bogata s kisikovimi funkcionalnimi skupinami, kar se izraža v izredno veliki hidrofilitnosti prvotno hidrofobnega materiala [7].

2 EKSPERIMENTALNE METODE

Kot podlago za razraščanje celic smo izbrali polistiren (PS). Gre za zmerno hidrofoben material, na



Slika 1: Strukturna formula polistirena (PS)

katerem je kontaktni kot vodne kapljice okoli 85°. Strukturna formula tega polimera je prikazana na **sliki 1**.

Polimerne folije smo obdelali s kisikovo plazmo v ustreznem plazemskem reaktorju [17, 18]. Osrednji del reaktorja je steklena cev premera 4 cm in dolžine 60 cm. Okoli cevi je ovita bakrena tuljava, ki je priključena na visokofrekvenčni generator. Generator deluje pri industrijski frekvenci 27,12 MHz in ima nazivno moč 400 W. Zaradi slabe usklajenosti med primarnim resonančnim krogom generatorja in sekundarnim krogom, ki ga predstavlja bakrena tuljava, je koristna moč skoraj 10-krat manjša od nazivne moči generatorja.

Stekleno cev na eni strani črpamo z dvostopenjsko rotacijsko črpalko nazivne črpalne hitrosti 16 m³/h, na drugi pa neprestano vpihujemo kisik iz jeklenke. Tlak merimo s kalibriranim Piranijevim merilnikom. Za vzbujanje plazme smo izbrali takšne razmere, pri katerih je tlak plina med črpanjem 75 Pa. Pri tem tlaku namreč dosežemo največjo stopnjo disociiranosti kisikovih molekul, ki je okoli 20 %. Čas obdelave vzorcev v kisikovi plazmi je 30 s.

Funkcionalne skupine na površini obdelovancev pred plazemsko obdelavo in po njej smo ugotovili z rentgensko fotoelektronsko spektroskopijo (XPS). Vzorce smo vzbujali z monokromatsko rentgensko svetlobo AlK_α s kinetično energijo fotonov 1486,6 eV in merili energijo izsevanih fotoelektronov. V spektru fotoelektronov, ki prikazuje porazdelitev fotoelektronov po njihovi vezavni energiji, so vrhovi, značilni za elemente, ki so na površini vzorca. Iz takšnega preglednega spektra fotoelektronov je mogoče oceniti sestavo površinske plasti debeline nekaj nanometrov, visokoresolucijski spekter ogljika pa omogoča prepoznavanje specifičnih funkcionalnih skupin, ki nastajajo na površini polimera med plazemsko obdelavo.

2.1. Priprava HOS-celic

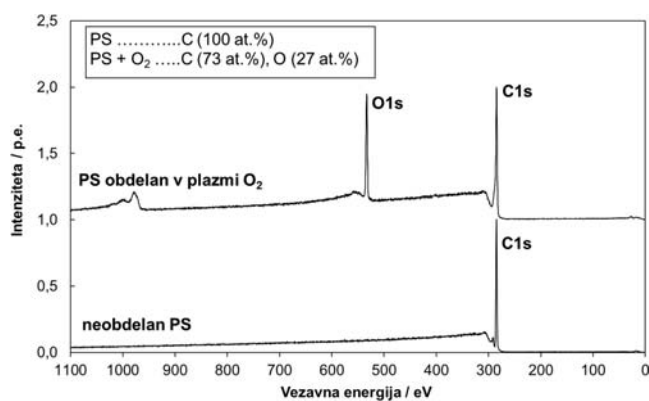
Človeške maligne kostne celice (HOS) so bile dobavljene iz American Type Culture Collection (ATCC). Vzorce smo po plazemski obdelavi inkubirali

v hranilnem mediju za rast celic (DMEM), ki smo mu dodali 10 % telečjega seruma (FCS), 2 mM L-glutamina in penicilina/streptomocina (1 000 enot na mililiter in 1 000 μg/L) [19]. Celice smo postavili v inkubator na temperaturo 37 °C pri konstantni vlažnosti s 5 % CO₂. Nato smo semikonfluentni kulturi za 5 min dodali 0,25 % prostorninskega deleža raztopine tripsina, kar je povzročilo, da so se celice odlepile od podlage. Dodali smo jim modrilo tripanko, pri čemer so se žive celice obarvale modro, mrtve pa so ostale neobarvane [20]. Žive celice smo nato prešteli z Bürker-Turkovim hemocitometrom in jih nato dalje uporabili za poskus.

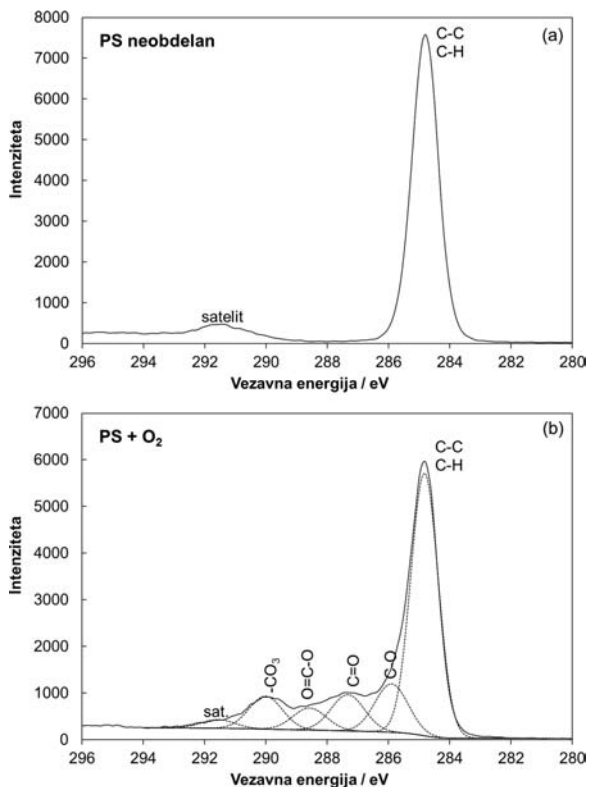
3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Na **sliki 2** prikazujemo pregledni spekter fotoelektronov za neobdelan in plazemsko obdelan polistiren. Na neobdelanem vzorcu prevladuje vrh ogljika, kar je posledica sestave tega polimera (**slika 1**). Po plazemski obdelavi lahko opazimo tudi izrazit vrh kisika, ki ga pripišemo kemijski vezavi atomskega kisika iz plazme. Podrobnejša analiza funkcionalnih skupin [14] je razvidna iz visokoresolucijskega spektra, ki je prikazan na **sliki 3a**. Za neobdelan vzorec opazimo enovit ogljikov vrh, ki pripada vezavi ogljikovih atomov na sosednje ogljikove in vodikove atome. Levo od glavnega vrha lahko opazimo tudi nižji, vendar lepo opazen vrh, ki je značilen za aromatske polimere.

Na **sliki 3b** je prikazan tudi visokoresolucijski vrh ogljika po obdelavi s kisikovo plazmo. Odsotnost vrha, ki je značilen za aromatske polimere, pripišemo cepljenju benzenovih obročev na površini polimera zaradi oksidacije materiala. Ogljikov vrh sedaj ni enovit, ampak opazimo več podvrhov, ki ustrezajo različnim s kisikom bogatim funkcionalnim skupinam. Kisikova plazma je torej povzročila nastanek polarnih funkcionalnih skupin, kar se na makroskopskem nivoju izraža z velikim povečanjem površinske energije materiala.

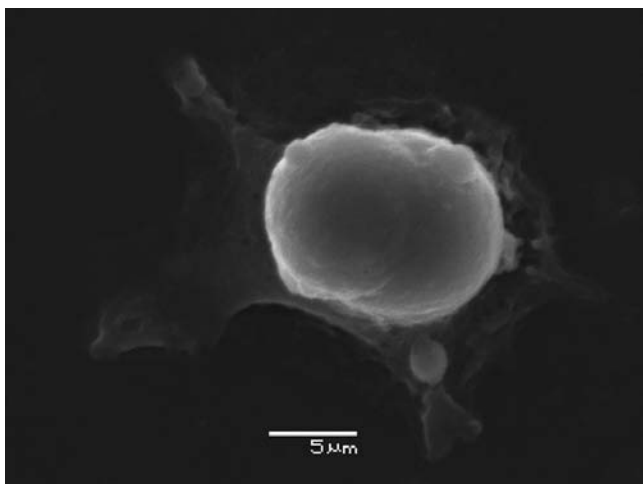


Slika 2: Pregledni XPS-spekter za neobdelan PS in PS, obdelan v kisikovi plazmi

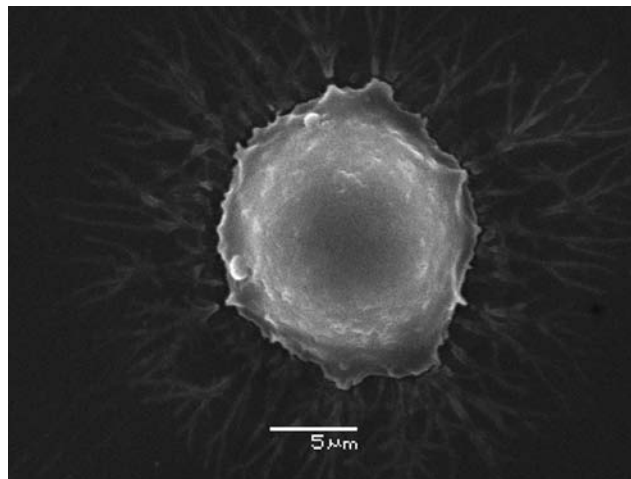


Slika 3: Visokoresolucijski ogljikov vrh C1s za (a) neobdelan PS in (b) PS po obdelavi s kisikovo plazmo (označeni so podvrhovi, ki prikazujejo različne funkcionalne skupine, nastale na površini PS po obdelavi s kisikovo plazmo)

Tako obdelane vzorce smo inkubirali z malignimi kostnimi celicami. Na **sliki 4** prikazujemo značilno sliko celice na površini neobdelanega materiala, na **sliki 5** pa na površini materiala, ki je bil predhodno obdelan s kisikovo plazmo. Bistvena razlika med obema slikama je v pojavu nitastih (fibrilnih) struktur, ki jih opazimo na **sliki 5**, in se izraža v obliki drobnih izrastkov, ki se širijo v okolico celice. Tovrstne strukture omogočajo odličen oprijem celice na



Slika 4: SEM-slika maligne kostne celice (HOS-celice) na površini neobdelanega PS



Slika 5: SEM-slika maligne kostne celice (HOS-celice) na površini PS, obdelanega s kisikovo plazmo

podlago in s tem zagotovijo pogoje za celično rast in razmnoževanje. Tovrstnih struktur ni opaziti v okolici celic, ki smo jih nanесли na neobdelane polistirenske podlage.

Razliko v oprijemu celic pripišemo funkcionalnih skupinam, ki so na površini polimernih podlag. Dokler imamo na površini zgolj nepolarne funkcionalne skupine, celica ne prepozna polistirena kot optimalne podlage za rast in razmnoževanje. Po daljšem času bi se celice sicer prilagodile tudi na to podlago, saj je znano, da je prav polistiren zelo pogost material, ki se uporablja za tovrstne raziskave. Z znanstvenega vidika je zelo pomembno dejstvo, da se celice zelo hitro čvrsto vežejo na plazemsko obdelane podlage. Tako čvrsta vezava lahko omogoča zajemanje malignih celic že v krvnem obtoku, s čimer je mogoče zaustaviti prenos metastaz od žarišča v odročne dele telesa in s tem upočasniti metastaziranje. Za praktično uporabo je izredno pomembno dejstvo, da je mogoče z neravnovesno kisikovo plazmo enakomerno funkcionalizirati polimerne materiale kompleksnih oblik.

Kot smo že omenili, je temperatura plinskih molekul enaka sobni. Pri teh razmerah se molekule in atomi kaotično gibljejo v plazemskem reaktorju. Gostota toka atomov in molekul je zaradi tega izotropna, kar v praksi pomeni, da lahko reaktivni kisikovi atomi dosežejo površino polimera tudi v vdolbinah in režah. Pri tlaku 75 Pa je povprečna prosta pot kisikovih atomov in molekul reda velikosti 0,1 mm, tako da zlahka dosežejo površine v notranjosti por tovrstnih dimenzij. V notranjost manjših in globljih por kisikovi atomi sicer lahko prodirajo, vendar pa njihova gostota z globino postopno pada. Razlog za to je izguba atomov zaradi kemijskih reakcij na površini obdelovanja, kakor tudi postopne rekombinacije atomov v molekule. K sreči sta oba procesa razmeroma malo verjetna, zaradi česar je omogočena tudi funkcionalizacija.

lizacija obdelovancev s precej kompleksno obliko. Oba procesa sta sicer eksotermna, zaradi česar se material med plazemsko obdelavo segreva, ker pa sta malo verjetna, lahko vseeno dosežemo primerno stopnjo funkcionaliziranosti pri dovolj nizki temperaturi, s čimer se izognemo morebitnim spremembam drugih funkcionalnih lastnosti polimernih materialov.

4 SKLEP

V prispevku smo opisali odziv malignih kostnih celic na funkcionalne skupine na površini polistirena. Ugotovili smo, da že kratkotrajna obdelava s kisikovo plazmo omogoči bistveno boljši oprijem celic na podlago. Izboljšanje vezave je posledica visoke omočljivosti plazemsko obdelanih površin, ki jo dosežemo z nasičenostjo s kisikovimi funkcionalnimi skupinami. Maligne kostne celice na tako obdelanih površinah že po kratkotrajni inkubaciji razvijejo nitaste strukture, kar omogoča odličen oprijem, ki je nujen za rast in razmnoževanje celic. Opisane raziskave so prvi korak v razvoju materialov za selektivno adsorpcijo rakastih celic, kar lahko v končni fazi privede do zmanjšanja razvoja metastaz pri rakastih obolenjih.

5 LITERATURA

- [1] A. Asadinezhad, I. Novak, M. Lehocky, V. Sedlarik, A. Vesel, I. Junkar, P. Saha, I. Chodak, *Plasma Processes Polym.*, 7 (2010), 504–514
- [2] M. Lehocky, L. Lapcik, M. C. Neves, T. Trindade, L. Szyk-Warszynska, P. Warszynski, D. Hui, *Mat. Sci. Forum*, 426 (2003), 2533–2538
- [3] A. Asadinezhad, I. Novak, M. Lehocky, V. Sedlarik, A. Vesel, I. Saha, I. Chodak, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 77 (2010), 246–256
- [4] E. Velzenberger, I. Pezron, G. Legeay, M. D. Nagel, K. El Kirat, *Langmuir*, 24 (2008), 11734–11742
- [5] G. Legeay, F. Poncin-Epaillard, C. R. Arciola, *Int. J. Artif. Organs*, 29 (2006), 453–461
- [6] B. Kasemo, *Surf. Sci.*, 500 (2002), 656–677
- [7] D. Klee, H. Höcker, *Adv. Polym. Sci.*, 149 (2000) 1–57
- [8] P. A. Ramires, L. Mirengi, A. R. Romano, F. Palumbo, G. Nicolardi, *J. Biomed. Mater. Res.*, 51 (2000), 535–539
- [9] F. R. Pu, R. L. Williams, T. K. Markkula, J. A. Hunt, *Biomaterials*, 23 (2002), 4705–4718
- [10] C. M. Alves, Y. Yang, D. L. Carnes, J. L. Ong, V. L. Sylvia, D. D. Dean, C. M. Agrawal, R. L. Reis, *Biomaterials*, 28 (2007), 307–315
- [11] D. P. Dowling, I. S. Miller, M. Ardaoui, W. M. Gallagher, *J. Biomater. Appl.*, 1 (2010), 1–21
- [12] T. Desmet, R. Morent, N. De Geyter, C. Leys, E. Schacht, P. Dubruel, *Biomacromolecules*, 10 (2009), 2351–2378
- [13] K. E. Geckeler, R. Wacker, F. Martini, A. Hack, W. K. Aicher, *Cell Physiol. Biochem.*, 13 (2003), 155–164
- [14] A. Vesel, *Surf. Coat. Technol.*, 205 (2010), 490–497
- [15] A. Vesel, I. Junkar, U. Cvelbar, J. Kovač, M. Mozetič, *Surf. Interface Anal.*, 40 (2008), 1444–1453
- [16] A. Vesel, *Inf. Midem*, 38 (2009), 257–265
- [17] D. Vujošević, Z. Vranica, A. Vesel, U. Cvelbar, M. Mozetič, A. Drenik, T. Mozetič, M. Klanjšek Gunde, N. Hauptman, *Mater. Tehnol.*, 40 (2006), 227–232
- [18] U. Cvelbar, M. Mozetič, N. Hauptman, M. Klanjšek-Gunde, *J. Appl. Phys.*, 106 (2009), 103303-1–103303-5
- [19] L. Mrakovčić, R. Wildburger, M. Jaganjac, M. Cindrić, A. Cipak, S. Borović-Sunjić, G. Waeg, A. M. Milanković, N. Žarković, *Acta Biochim. Pol.*, 57 (2010), 173–178
- [20] M. Jaganjac, T. Matijević, M. Cindrić, A. Cipak, L. Mrakovčić, W. Gubisch, N. Žarković, *Acta Biochim. Pol.*, 57 (2010), 179–183