

PLAZEMSKA MODIFIKACIJA POLIMERNIH MATERIALOV ZA BIOMEDICINSKE APLIKACIJE

Alenka Vesel¹, Nina Recek^{1, 2}, Martina Modic¹

ZNANSTVENI ČLANEK

¹Institut »Jožef Stefan«, Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

²Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Jamova 39, 1000 Ljubljana

POVZETEK

Plazma se pogosto uporablja za spremembo površinskih lastnosti polimernih materialov. V prispevku prikazujemo nekaj primerov modifikacije polimernih materialov za biomedicinske aplikacije, kot so npr. sprememba protitrombogenih lastnosti površine z vezavo posebnih protitrombogenih polisaharidnih prevlek ali brez nje, imobilizacija proteinov in vezava celic ter modifikacija obližev za rane za izboljšanje njihovih sorpcijskih lastnosti in izboljšanje antibakterijskih lastnosti tkanin.

Ključne besede: polimeri v medicini, plazma, površinska modifikacija, adhezija, proteini, celice

Plasma modification of polymer materials for biomedical applications

ABSTRACT

Plasma is often used for surface modification of polymer materials. In this contribution we present some examples of plasma treatment of polymer surfaces for biomedical applications like enhancing antithrombogenic surface properties with or without applying special antithrombogenic polysaccharide coatings, immobilization of proteins, and cell adhesion and modification of wound-dressings for enhancing its sorption capacity and reducing antimicrobial activity.

Keywords: polymers in medicine, plasma, surface modification, adhesion, proteins, cells

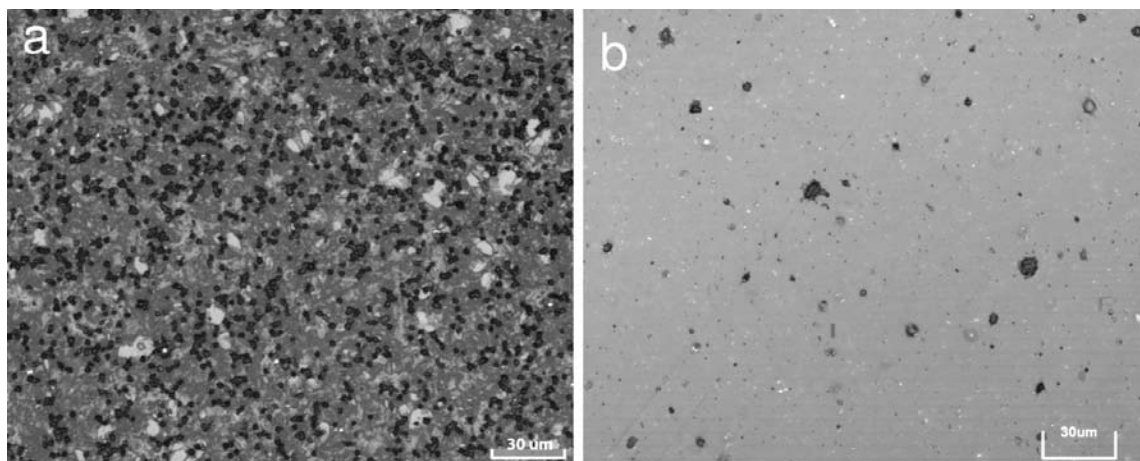
1 UVOD

Plazma (električna plinska razelektritev) se pogosto uporablja pri različnih tehnologijah, kot so čiščenje, selektivno jedkanje, sterilizacija, modifikacija površinskih lastnosti ter sinteza nanodelcev. Predvsem uporaba plazme za modifikacijo površinskih lastnosti polimernih materialov ima zelo širok spekter uporabe,

saj pri tem pride do spremembe različnih lastnosti, kot so omočljivost površine, hrapavost in funkcionalizacija. Zato se ta metoda čedalje pogosteje uporablja za izboljšanje oprijemljivosti in adhezije različnih prevlek. Primere takšne plazemske obdelave najdemo npr. v: (i) avtomobilski industriji za izboljšanje nanosa barvil ali kovinskih prevlek na polimerno podlago, (ii) v prehrabni industriji za sterilizacijo in vezavo antibakterijskih prevlek na embalažo, ki je namenjena shranjevanju živil ter (iii) v raznih biomedicinskih aplikacijah, ki bodo v nadaljevanju predstavljene bolj podrobno.

2 PLAZEMSKA OBDELAVA UMETNIH ŽIL ZA DOSEGANJE PROTITROMBOGENIH UČINKOV

Umetni implantati (kot so umetne žile, srčne zaklopke, katetri itd.) so po navadi narejeni iz polimernih materialov [1]. Najbolj pogosto uporabljeni polimer je polietilen tereftalat (PET). Vendar pa v primeru implantacije umetnih implantatov pogosto prihaja do komplikacij, zaradi postoperativnih zapletov, ki lahko vodijo k pojavu krvnih strdkov in tromboze [2]. Da bi se temu izognili, je treba spremeniti površinske lastnosti polimernih implantatov na način, da bo kar se da majhna adhezija trombocitov in stopnja njihove aktivacije. To lahko dosežemo na dva načina: (i) s plazemsko obdelavo v kisikovi plazmi ali (ii) z vezavo posebnih protitrombogenih polisaharidnih prevlek na polimerno površino, kjer plazmo



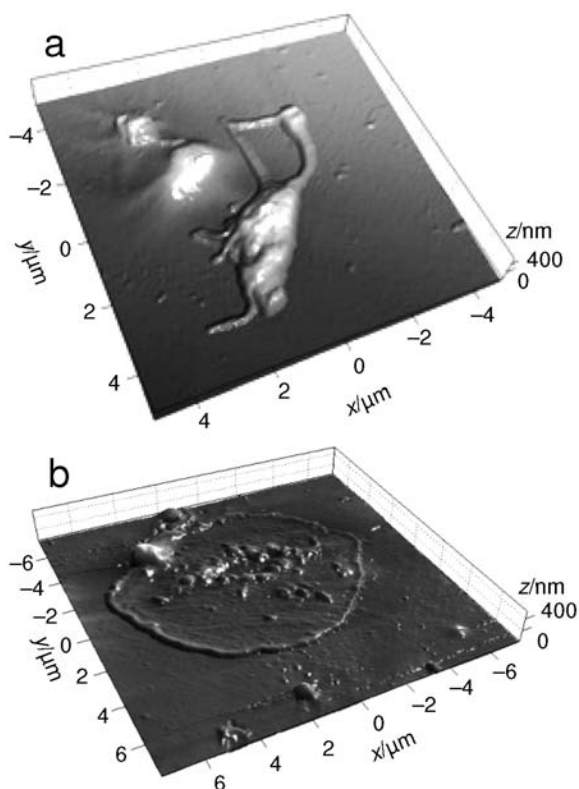
Slika 1: Adhezija trombocitov na neobdelano površino polimera PET (a) in na površino, ki je bila obdelana v kisikovi plazmi (b) [3]

uporabimo samo za predhodno aktivacijo polimerne površine za izboljšano vezavo prevleke.

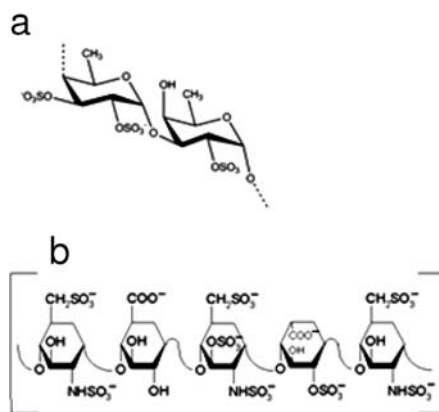
Na **sliki 1** je prikazan primer površine polimera PET, ki se uporablja za izdelavo umetnih žil. **Slika 1a** prikazuje vezavo trombocitov na površino neobdelanega polimera, ki je izjemno trombogena, saj so trombociti na gosto porazdeljeni po celi površini. Če polimer obdelamo v kisikovi plazmi, se število vezanih trombocitov drastično zmanjša (**slika 1b**), zato lahko trdimo, da taka površina deluje protitrombogeno.

Ne samo da je število vezanih trombocitov občutno manjše, tudi tisti trombociti, ki jim je le uspela vezava na površino, so ostali v neaktivni obliki, kar je razvidno iz njihove morfologije (**slika 2a**). Na neobdelani površini, ki je trombogena, so trombociti namreč močno razpotegnjeni po površini, kar nakazuje na njihov zelo dober oprijem površine (**slika 2b**). Protitrombogene lastnosti površine lahko dobimo le z obdelavo polimera v kisikovi plazmi, ne pa tudi v plazmi, ustvarjeni v dušiku.

Pomembno se je tudi zavedati, da je efekt plazemske obdelave kratkotrajen, zato bi bilo treba tak postopek izvesti isti dan, kot bi se izvajala operacija.



Slika 2: AFM-slika trombocita na polimerni površini, obdelani v kisikovi plazmi (a) in na neobdelani polimerni površini (b). Na sliki je razvidna razlika v stopnji aktivacije trombocita. Slika a prikazuje dendritično obliko trombocitov, ki je glede na stopnjo aktivacije predhodna oblika popolnoma razširjene oblike oz. najbolj aktivirane oblike, ki je prikazana na sliki b.



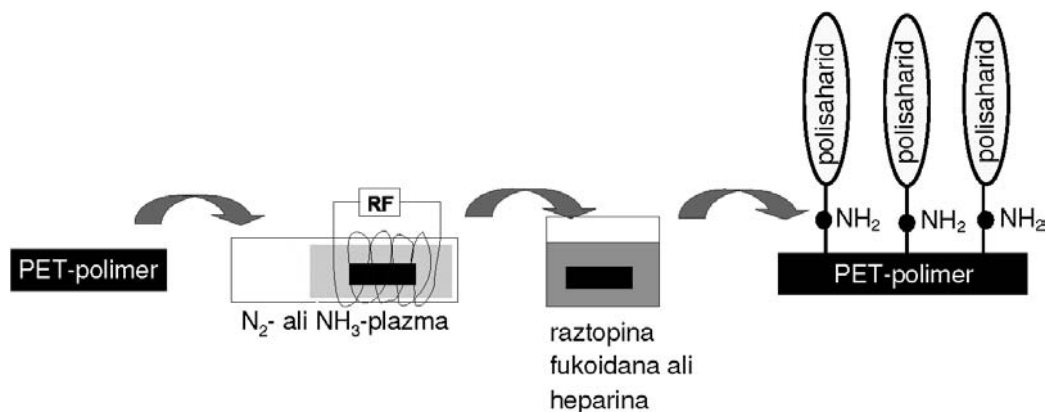
Slika 3: Kemijska struktura fukoidana (a) in heparina (b)

Drugi način, kako preprečiti adhezijo trombocitov, pa je vezava posebnih protitrombogenih prevlek iz polisaharidov na površino polimera. Ta postopek vezave je kompleksnejši v primerjavi s samo plazemsko obdelavo, nimamo pa več problema s staranjem površine. Pri vezavi protitrombogenih polisaharidnih prevlek na dokaj inertno površino polimera si zopet pomagamo s plazemsko obdelavo. Pri tem s plazmo povzročimo nastanek novih funkcionalnih skupin na površini, ki delujejo kot vezavna mesta za nadaljnjo vezavo polisaharidnih prevlek. Najbolj obetajoči protitrombogeni polisaharidni prevleki sta fukoidan [4] in heparin [5], ki sta prikazana na **sliki 3**.

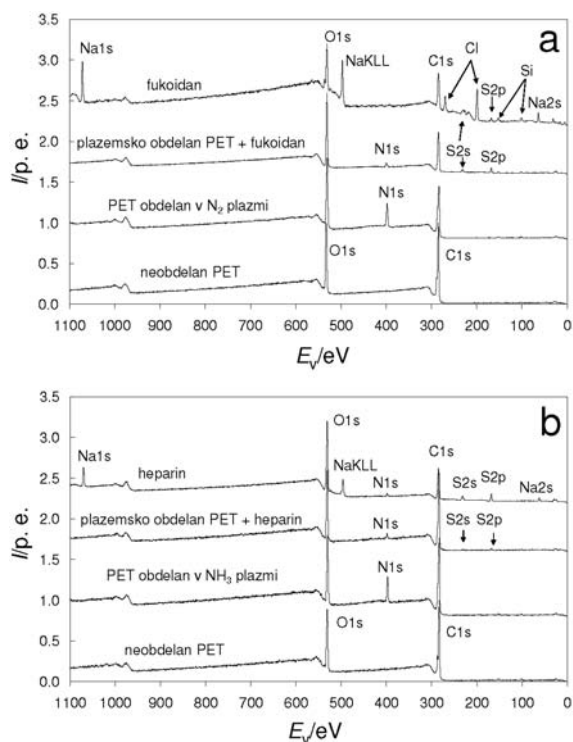
Izboljšano vezavo teh protitrombogenih substanc na polimerno površino lahko dosežemo z obdelavo bodisi v dušikovi ali amonijevi plazmi, saj je na površino potrebno vezati amino ($-NH_2$) skupine, preko katerih lahko potem vežemo molekuli fukoidana ali heparina (**slika 4**). Razlog je elektrostatski privlak, saj je heparin oz. fukoidan zelo močno negativno nabit, površina funkcionalizirana z NH_2 pa pozitivno nabit.

Uspešnost vezave smo spremljali z metodo rentgenske fotoelektronske spektroskopije (XPS). Na **sliki 5** prikazujemo pregledne XPS-spektre površine polimera PET pred plazemsko obdelavo v plazmi, vsebujoči dušik, in po njej ter po vezavi fukoidana (**slika 5a**) ali heparina (**slika 5b**). V obeh primerih je za primerjavo prikazan še spekter čistega fukoidana in heparina. Po plazemski obdelavi se na polimerni površini pojavi nov dušikov vrh N1s, kar kaže na uspešnost funkcionalizacije površine z dušikovimi funkcionalnimi skupinami, med katerimi so tudi aminoskupine. Poleg dušikovega vrha sta na plazemsko obdelanem polimeru še vrhova ogljika C1s in kisika O1s, ki sta značilna že za neobdelan polimer PET.

Ko plazemsko obdelan polimer PET inkubiramo v raztopini fukoidana ali heparina, opazimo dve pomembni razliki: (i) na površini polimera se pojavi žveplo, ki izvira iz omenjenih polisaharidov, in



Slika 4: Shematičen prikaz vezave protitrombogenih prevlek na površino plazemsko obdelanega polimera



Slika 5: Pregledni XPS-spektri polimerne površine pred plazemsko obdelavo ter po njej ter po inkubaciji v polisaharidni raztopini. Slika a prikazuje primer inkubacije polimera v fukoidanu [6], slika b pa primer inkubacije v heparinu.

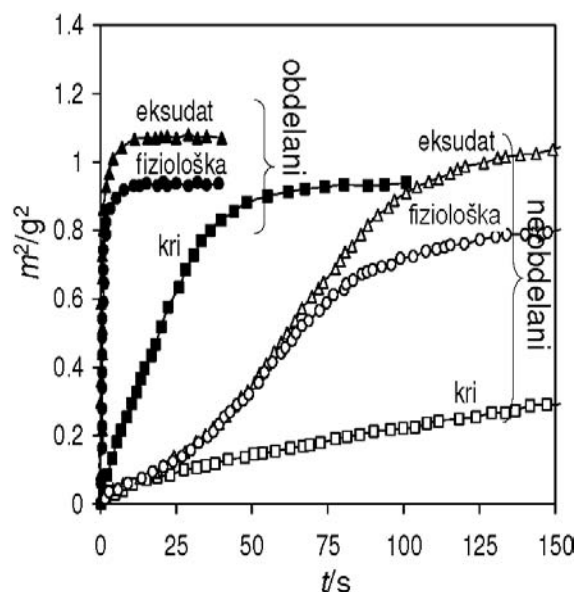
(ii) koncentracija dušika na površini polimera se zmanjša. Tu je treba omeniti, da heparin lahko že sam po sebi vsebuje nekaj dušika (v zelo majhnih koncentracijah), medtem ko le-ta v fukoidanu ni prisoten. Padec koncentracije dušika in pojav žvepla nazorno prikazuje, da je na površini tanka plast fukoidana oz. heparina.

3 PLAZEMSKA OBDELAVA MEDICINSKIH OBLIŽEV ZA RANE

Drugi primer uporabe plazme v medicinskih aplikacijah je modifikacija materialov, ki se uporabljajo za

sanitetne materiale npr. za obliže za rane. Obliži so po navadi večslojni, kar pomeni, da so sestavljeni iz več plasti, od katerih ima vsaka svojo vlogo. Začeni deli obližev hidrofozna mrežica, hidrofilna vpojna plast in zaščitna prevleka. Lahko pa imajo obliži še bolj kompleksno sestavo. Naloga hidrofozne mrežice je, da preprečuje, da bi se obliž prilepil na rano. Naloga hidrofilne plasti pa je vpijanje čim večje količine telesnih tekočin, ki izvirajo iz rane, za njeno hitrejše celjenje. Za izboljšanje funkcionalnosti obližev, lahko plazmo uporabimo tako za izboljšanje hidrofozizacije hidrofozne mrežice – v tem primeru uporabimo plazmo, ustvarjeno v CF_4 -plazmi, kot tudi za izboljšanje hidrofilnosti vpojnega materiala – v tem primeru uporabimo plazmo, ustvarjeno v O_2 -plazmi, da bi dosegli kar se da najboljšo sposobnost vpijanja tekočin.

Na **sliki 6** prikazujemo sorpcijske lastnosti celulozne tkanine iz Tosame pred obdelavo v kisikovi



Slika 6: Primerjava kapilarnih hitrosti treh različnih tekočin (fiziološka raztopina, eksudat in sintetična kri) pred obdelavo celulozne tkanine v kisikovi plazmi in po njej

plazmi in po njej. Njene sorpcijske lastnosti smo ugotavljali z merjenjem kapilarne hitrosti za tri različne telesne tekočine: za fiziološko raztopino, eksudat in kri. S **slike 6** je jasno razvidno, da se hitrost absorpcije tekočine po plazemski obdelavi drastično poveča [7].

Pri oskrbi rane z obliži pa se srečujemo še z enim problemom – to je z vnetjem kot posledico okužbe z bakterijami. Temu se lahko izognemo z uporabo snovi s protimikrobnimi lastnostmi. Taka površina zavira razvoj bakterij. Za doseganje protimikrobnosti se pogosto uporabljajo srebrovi nanodelci ali pa derivati iz citozana, ki vsebujejo aminoskupine, ki delujejo protimikrobno. Tudi tukaj lahko uporabimo amonijevo NH_3 -plazmo in namesto citozana nanjo vežemo aminoskupine. Naši prvi rezultati so že pokazali obetajoče možnosti, saj se je razvoj bakterij na takšni površini zmanjšal.

Poskusili pa smo tudi drugo možnost – to je vezavo srebrovih nanodelcev. Pri tem smo tkanino obdelali v vodni plazmi, da bi izboljšali adhezijo srebrovih nanodelcev na plazemsko obdelano površino. Vsebnost srebra v plazemsko obdelani tkanini se je tako povečala za več kot 50 % v primerjavi z neobdelano tkanino [8].

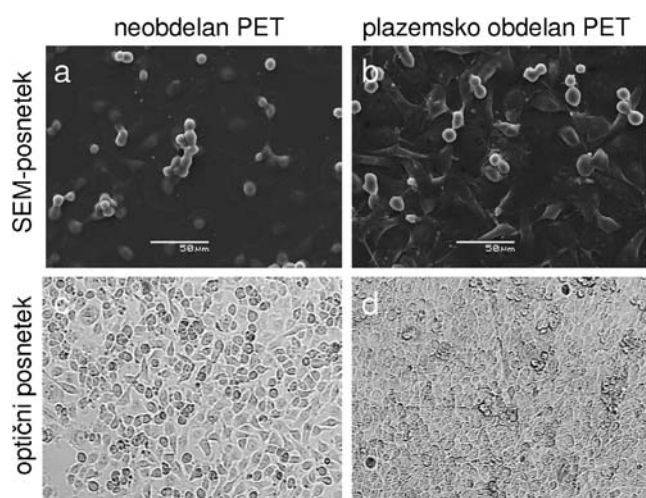
4 PLAZEMSKA OBDELAVA POLIMERNIH MATERIALOV ZA IZBOLJŠANO PROLIFERACIJO CELIC

V prvem primeru (poglavje 2) smo se dotaknili problema trombogenosti umetnih implantatov, kot so umetne žile. To pa ni edini problem polimernih vsadkov. V zvezi z materiali, ki se uporabljajo za implantate pogosto govorimo o njihovi biokompatibilnosti,

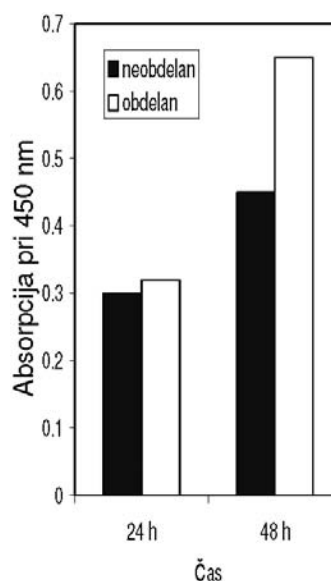
kar pomeni sposobnost materiala, da ne izzove imunološkega odziva gostitelja in da reagira s celicami in obdajajočimi telesnimi tekočinami na podoben način kot pravo telesno tkivo [9]. Eden izmed pomembnih dejavnikov je dobra endotelizacija (vezava endotelijskih celic) umetnega implantata. Vezavo endotelijskih celic lahko močno izboljšamo z obdelavo polimernih materialov v plazmi. Drugi primer plazemske aplikacije so tudi površine, ki jih uporabljamo kot gojišča celic za gojenje umetnih tkiv ali umetnih organov. V zadnjem primeru uporabljamo 3D-porozno strukturo (angl. *scaffold*) iz biorazgradljivega polimera, ki se uporablja kot ogrodje umetnega organa.

Primer uporabe plazme (kisikove) za izboljšanje proliferacije endotelijskih celic HMEC (angl. *human microvascular endothelial cells*) je prikazan na **sliki 7**. **Sliki 7a** in **c** prikazujeta celice na neobdelani polimeri površini, **sliki 7b** in **d** pa na plazemsko obdelani. Poleg slik, ki smo jih posneli z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM, **sliki 7a** in **b**), so prikazani tudi posnetki, narejeni z optičnim mikroskopom (**sliki 7c** in **d**). S slik je razvidno, da so celice na plazemsko obdelani površini gostejše in bolj razpotejnene po površini, kar je jasen znak, da je površina ugodna za njihovo razraščanje. Opazimo lahko tudi celice, ki so v mitozni oziroma so se že delile na dva dela. V primeru neobdelanega polimera pa je celic manj in so bolj okrogle oblike, kar kaže na neudobno okolje.

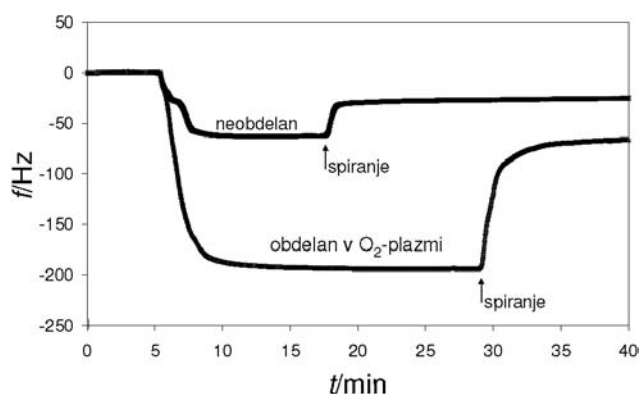
Da dobimo na plazemsko obdelani površini več celic, je razvidno tudi s **slike 8**, kjer z biološkim preizkusom (t. i. MTT-test) preko kolorimetrične reakcije merimo metabolično aktivnost celic. Na površini z več celicami (to je na plazemsko obdelani površini) zaznamo večjo metabolično aktivnost.



Slika 7: SEM- (povečava 500-kratna) in optični posnetki HMEC-celic na neobdelani površini polimera PET in v kisikovi plazmi obdelani površini polimera PET. Slike SEM so bile posnete po 4 h, optične pa po enem dnevu.



Slika 8: MTT-meritve metabolične aktivnosti celic



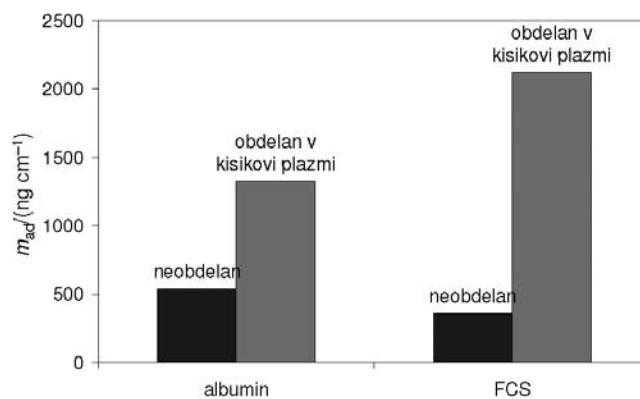
Slika 9: Meritve adsorpcije proteina albumina s kremenovo mikrotehtnico (QCM). Večja masa adsorbiranega proteina pomeni večjo spremembo frekvence.

5 PLAZEMSKA OBDELAVA POLIMERNIH MATERIALOV ZA IMOBILIZACIJO PROTEINOV

Poleg vezave celic imajo pomembno vlogo pri zagotavljanju biokompatibilnosti materiala tudi proteini. Če smo bolj natančni, so ravno proteini tisti, ki se najprej vežejo na površino, saj je adhezija in razraščanje celic počasen in dolgotrajen proces. Vezava proteinov na površino polimernih implantatov pa ni edini primer. Proteini igrajo čedalje pomembnejšo vlogo tudi pri razvoju novih načinov zdravljenja raznih bolezni z uporabo nanodelcev, ki so oplašeni s proteini in raznimi zdravilnimi substancami (angl. *drug delivery*) [10].

Kot v vseh prejšnjih primerih si lahko tudi tukaj pomagamo s plazemsko obdelavo. **Slika 9** prikazuje meritve adsorpcije proteina albumina na površino polimera PET, ki smo ga nanegli na površino kremenovega kristala. Maso adsorbiranega proteina, ki je sorazmerna s spremembo frekvence kristala, smo merili s kremenovo mikrotehtnico (QCM). Prva krivulja prikazuje adsorpcijo proteina albumina na neobdelanem polimeru PET, druga pa na polimeru obdelanemu v kisikovi plazmi. Opazimo lahko, da je sprememba frekvence kristala v primeru obdelave polimera v kisikovi plazmi bistveno večja kot pri neobdelanem polimeru, kar pomeni večjo maso adsorbiranega proteina na plazemsko obdelani površini.

Ta razlika je še večja v primeru adsorpcije telečjega seruma FCS (angl. *fetal calf serum*) (**slika 10**). FCS je mešanica različnih proteinov (med katerimi je najpomembnejši albumin). Na **sliki 10** torej prikazujemo primerjavo mase adsorbiranih proteinov iz čistega albumina in mešanice FCS na neobdelanem in plazemsko obdelanem polimeru.



Slika 10: Primerjava mase adsorbiranih proteinov albumina in FCS na neobdelanem in plazemsko obdelanem polimeru PET. Masa adsorbiranega proteina je bila izračunana iz QCM-meritev.

6 SKLEP

Prikazali smo nekaj primerov uporabe plazme za površinsko modifikacijo polimernih materialov v biomedicinskih aplikacijah. S primerno plazemsko obdelavo lahko vplivamo na adhezijske lastnosti površine (kot je npr. vezava trombocitov, celic, proteinov ali bioaktivnih prevlek) ali pa na njene sorpcijske lastnosti (kot v primeru obližev za rane). Do njene praktične uporabe v bolnišnicah pa je najbrž še daleč, verjetno predvsem zaradi zamudnih in dolgotrajnih preizkusov.

ZAHVALA

Za rezultate, prikazane na sliki 6, se zahvaljujemo dr. Zdenki Peršin (projekt Večplastni medicinski materiali, Polimat, Center odličnosti). Zahvaljujemo se tudi Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije.

7 LITERATURA

- [1] J. Jagur-Grodzinski, *Polym. Advanc. Technol.*, 17 (2006), 395–418
- [2] B. T. Allen, R. E. Sparks, M. J. Welch, N. S. Mason, C. J. Mathias, R. E. Clark, *J. Surg. Res.*, 36 (1984), 80–88
- [3] M. Modic, I. Junkar, A. Vesel, M. Mozetič, *Surf. Coat. Technol.*, 213 (2012), 98–104
- [4] B. Li, F. Lu, X. Wei, R. Zhao, *Molecules*, 13 (2008), 1671–1695
- [5] S. T. Olson, Y. J. Chuang, *Trends Cardiovasc. Med.*, 12 (2002), 331–338
- [6] A. Vesel, M. Mozetic, S. Strnad, *Vacuum*, 85 (2011), 1083–1086
- [7] Z. Peršin, M. Devetak, I. Drevenšek, A. Vesel, M. Mozetič, K. Stana-Kleinschek, *Carbohydrate Polym.*, 97 (2013), 143–151
- [8] M. Gorjanc, V. Bukošek, M. Gorenšek, A. Vesel, *Tex. Res. J.*, 80 (2010), 557–567
- [9] B. Kasemo, *Surf. Sci.*, 500 (2002), 656–677
- [10] J. Chomoucka, J. Drbohlavova, D. Huska, V. Adam, R. Kizek, J. Hubalek, *Pharmacological Res.*, 62 (2010), 144–149