

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### INTERAKCE KMENOVÝCH BUNĚK S POLYMERNÍM SUBSTRÁTEM

NIKOLA SLEPIČKOVÁ KASÁLKOVÁ<sup>a</sup>, PETR SLEPIČKA<sup>a</sup>, LUCIE BAČÁKOVÁ<sup>b</sup>, ZDEŇKA KOLSKÁ<sup>c</sup> a VÁCLAV ŠVORČÍK<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav inženýrství pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha,

<sup>b</sup> Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky, Viděňská 1083, 142 20 Praha, <sup>c</sup> Přírodovědecká fakulta, Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, České mládeže 8, 400 96 Ústí n. L.

nikola.kasalkova@vscht.cz

Došlo 20.12.16, přijato 2.3.17.

Klíčová slova: polymer, plazma, povrchová modifikace, cytokompatibilita, kmenové buňky

#### Úvod

V poslední době uplatňovaným trendem v oblasti tkáňového inženýrství je vytváření povrchů, které podporují kolonizaci buněk a dobrou integraci dané náhrady do okolního prostředí pacientova organismu. V řadě případů nejsou umělé materiály pouze pasivně tolerovány buňkami, ale musí také sloužit jako bioaktivní a biomimetické, tzn. musí podporovat a indukovat buněčné reakce<sup>1,2</sup>.

Tkáňové inženýrství studuje i proliferaci buněk získaných z různých částí těla při zachování jejich specifické aktivity. Unikátní vlastnosti nanostruktur nejen ovlivňují buněčnou adhezi a interkonektivitu celé buněčné konstrukce na povrchu vzorku, ale také představují významný faktor pro strukturální a organizační stabilitu buněk<sup>3</sup>. Materiály jako např. chitosan<sup>4,5</sup>, kyselina polyglykolová (PGA)<sup>6</sup> nebo polymléčná (PLA)<sup>7</sup> slouží k přípravě tzv. buněčných nosičů, které umožňují buňkám vlastního těla růst a formovat se v nové tkáni, zatímco nosič je postupně absorbován.

Vlastnosti substrátu (chemické složení povrchu<sup>8,9</sup>, ale i povrchový náboj, smáčivost, modul elasticity<sup>10,11</sup>, zeta potenciál<sup>12–16</sup>) významně ovlivňují následné navazování a uspořádání různých typů buněk<sup>17</sup>. Buněčná afinita biomateriálů zahrnuje dva aspekty, (i) buněčnou adhezi a (ii) následný buněčný růst. „Ukotvení“ buněk v první fázi interakce je velmi důležité a výrazně ovlivňuje jejich následný růst, migraci a diferenciaci funkcí<sup>18,19</sup>.

Často se studují kmenové buňky získané z tukové tkáně (adipose stem cell, ASC). Jejich výhodou (ve srov-

nání s např. kmenovými buňkami získanými z kostní tkáně) je jejich snadná dostupnost (lze je získat v poměrně velkém množství z tukové tkáně odstraněné metodou liposukce), jejich nižší úmrtnost, vyšší proliferační kapacita a zpožděné stárnutí<sup>20</sup>. ASC mohou být *in vitro* diferenciovány na jiné typy buněk (např. osteoblasty, chondroblasty, buňky kosterní svaloviny, buňky hladkého svalstva, endoteliální buňky) a jsou také schopny transdiferenciovat do buněk typu neuronů, epitelových buněk, hepatocytů, buněk pankreatických ostrůvků<sup>21–23</sup>, apod.

V této práci byl studován vliv plazmatické modifikace kyseliny poly(L-mléčné) (PLLA) na adhezi a proliferaci kmenových buněk získaných z tukové tkáně (ASC). Polymerní film PLLA byl modifikován argonovým plazmatem za proměnných podmínek. Následně byl povrch analyzován a charakterizován několika metodami. Goniometricky by sledován kontaktní úhel (polarita), metodou mikroskopie atomárních sil (AFM) byla stanovena povrchová morfologie a drsnost, změna složení povrchové vrstvy byla analyzována metodou rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS) a stanovením elektrokinetického potenciálu (pomocí této metody byl také stanoven náboj vzorku). *In vitro* kultivaci ASC byla stanovena cytokompatibilita substrátu. Cílem tohoto experimentu bylo stanovení vhodného typu modifikace PLLA umožňující „ideální“ interakci mezi substrátem a buňkou.

#### Experimentální část

##### Materiál, modifikace

K experimentům byla použita fólie z kyseliny poly(L-mléčné) (PLLA, 50  $\mu\text{m}$ , 1,25 g cm<sup>-3</sup>, Goodfellow Ltd.). Povrch vzorků byl modifikován plazmatem (výkon 3 a 8 W, doba expozice 50–480 s) na zařízení Sputter Coater SCD 050 v režimu leptání (nosný plyn argon o čistotě 99,999 %, vzdálenost elektrod 50 mm).

##### Metody analýzy

Povrchová smáčivost původních i modifikovaných substrátů byla studována goniometricky. Kontaktní úhel (KU) byl měřen na přístroji DSA 100, KRÜSS GmbH, Německo. Měření bylo provedeno vždy na pěti vzorcích od všech modifikací za laboratorní teploty. Na vzorek bylo nanášeno 6 kapek destilované vody o objemu 6  $\mu\text{l}$ . K vyhodnocení KU byl použit software DSA4. Goniometrická měření byla prováděna na čerstvých (ihned po expozici) i zestárlých vzorcích z důvodu stanovení doby nutné k vyžrání vzorků. Ostatní analýzy a *in vitro* testy probíhaly na zestárlých vzorcích.

Chemické složení povrchu vzorků bylo studováno XPS spektroskopii (Omicron Nanotechnology ESCAProbeP,

zdroj záření 1486,7 eV, analyzovaná oblast  $2 \times 3 \text{ mm}^2$ ). Spektra byla měřena s krokem 0,05 eV.

Povrchová morfologie a drsnost vzorků byla studována mikroskopii atomárních sil (AFM, Veeco CP II, Bruker Corp.). Všechny vzorky byly měřeny v poklepovém módu. Drsnost vzorku je charakterizována veličinou  $R_a$  (střední drsnost povrchu). Tato veličina představuje aritmetický průměr odchylek Z-hodnot od střední (nulové) plochy.

Elektrokinetický potenciál byl stanoven na přístroji SurPASS (Anton Paar, Rakousko)<sup>24,25</sup> ve vodném roztoku KCl o molaritě 0,001 za laboratorní teploty a pH 6,9.

### Stanovení cytokompatibility

Stanovení cytokompatibility probíhalo pomocí kultivace *in vitro*. Tuková tkáň, která byla zdrojem kmenových buněk, byla získána při dvou různých tlacích. ASC získané z tkáně při nižším tlaku jsou označeny jako ASC LP, buňky získané z tkáně odebrané při vyšším tlaku jsou označeny ASC HP. Podmínky a postup sterilizace vzorků, nasazování buněk jsou popsány v práci Pařízka a spol.<sup>26</sup>. Kultivace probíhala 24, 96, resp. 168 h při teplotě 37 °C, vlhkosti 85 %, ve vzdušné atmosféře s 5 %  $\text{CO}_2$ .

Adheze a proliferace ASC byla stanovena jako počet buněk, které jsou fixovány a barveny přímo na testovaném substrátu, z fotografií pořízených pomocí mikroskopu<sup>12</sup>. Po uplynutí doby stanovené pro kultivaci byly vzorky s buňkami opláchnuty fosfátovým roztokem PBS a po dobu 45 min fixovány ledovým 75% ethanolem (−20 °C).

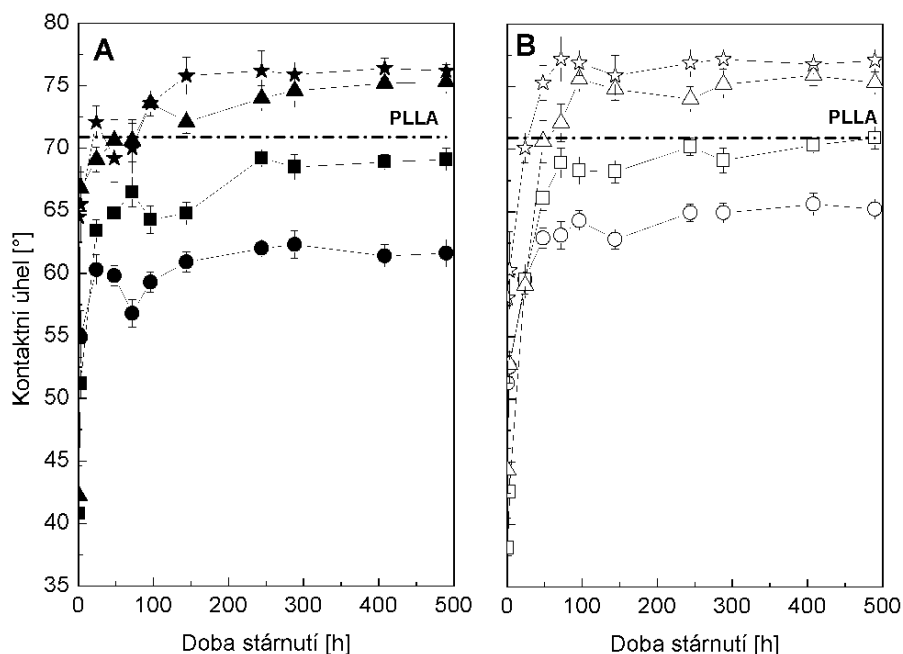
Následně byly znovu opláchnuty PBS a po dobu 1 h barveny směsí fluorescenčních barviv (Texas Red C2-maleimid a Hoechst). Počet buněk byl stanoven z fotografií pořízených pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX51 s využitím digitální kamery Olympus DP 70.

Životaschopnost kultivovaných buněk byla stanovena pomocí testu, který je založen na barvení buněk trypanovou modří. Před samotným vyhodnocením bylo nutno kultivované vzorky opláchnout fosfátovým pufrém a přemístit je do nových kultivačních plat obsahujících trypsin. Po uvolnění buněk bylo ke vzorkům přidáno médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Suspenze buněk byla homogenizována a 1 ml byl přenesen do kyvet. Pomocí automatického přístroje Cell Viability Analyzer (Vi-Cell XR, Beckman Coulter) byla stanovena životaschopnost buněk<sup>27</sup>.

## Výsledky a diskuse

### Povrchová smáčivost (kontaktní úhel)

Je známo, že plazmatická modifikace polymerních folií vede k vytvoření povrchu, jehož vlastnosti se s časem mění. Doba, po kterou dochází k těmto změnám, se označuje jako doba stárnutí nebo zrání a je nutné ji pro každý polymer a typ modifikace stanovit samostatně. Během stárnutí vzorku se výrazně mění např. smáčivost povrchu (tj. polarita, resp. kontaktní úhel). Vzorek lze považovat za



Obr. 1. Závislost kontaktního úhlu PLLA nemodifikovaného (čerchovaná přímka) a PLLA modifikovaného plazmatem o výkonu 3 (A) a 8 W (B) po dobu 50 s (kolečko), 120 s (čtvereček), 300 s (trojúhelník) a 480 s (hvězdička) na době stárnutí

zestárlý, pokud se hodnota kontaktního úhlu v čase již v rámci chyby měření nemění.

Závislost hodnoty kontaktního úhlu (KU) původního a modifikovaného PLLA na době stárnutí je uvedena na obr. 1A,B. Z obr. 1 je patrné, že hodnota kontaktního úhlu je závislá na době modifikace a výkonu plazmatu. Obdobně jako u předchozích experimentů<sup>28,29</sup>, i v této práci byl zaznamenán ihned po expozici výrazný pokles KU. Během stárnutí modifikovaného substrátu hodnota KU narůstá. K ustálení KU (tj. zestárnutí substrátů) dochází přibližně po 244 h po modifikaci. Tento jev (pokles KU a jeho následný růst) lze vysvětlit tvorbou nových kyslíkatých skupin na povrchu substrátu. Při stárnutí modifikovaných polymerů dochází k „reorientaci“ kyslíkatých skupin z povrchu do objemu polymeru, což se projevuje nárůstem hodnot KU (cit.<sup>27</sup>). Z obr. 1A,B je patrné, že smáčivost polymeru závisí na době expozice. Při krátkých dobách modifikace (do 120 s) jsou hodnoty KU u zestárých vzorků nižší než u nemodifikovaného PLLA. Pro delší doby modifikace (nad 300 s) jsou hodnoty KU u zestárých vzorků vyšší než u původního PLLA. Zvýšením výkonu plazmatu byl u zestárých vzorků zaznamenán mírný nárůst hodnot KU.

#### Chemické složení

Chemické složení povrchové vrstvy (tloušťka 6–8 atomových vrstev) všech vzorků byla studována metodou

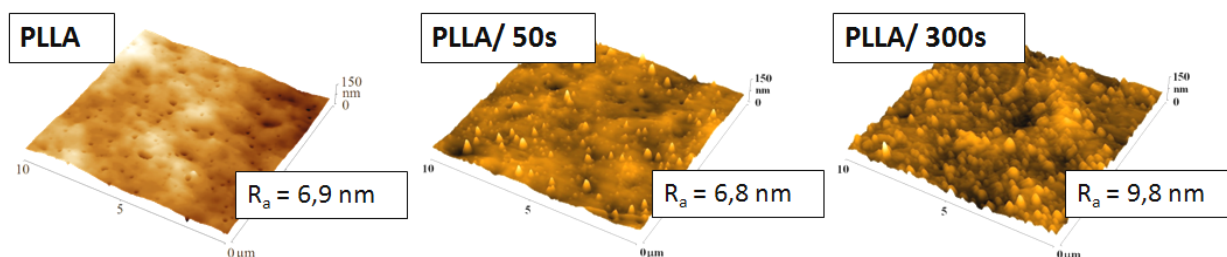
XPS. Atomární koncentrace prvků (C, O a N) je uvedena v tab. I. Z uvedených hodnot je patrné, že modifikace plazmatem vede k poklesu koncentrace kyslíku v povrchové vrstvě ve srovnání s původním PLLA (což odpovídá teorii o reorientaci kyslíkových skupin do objemu vzorku). U modifikovaných vzorků byla detegována i přítomnost dusíku v povrchové vrstvě. Přítomnost dusíku se vysvětluje reakcí aktivovaného povrchu se zbytkovým vzduchem v naprašovacím zařízení (reakce během modifikace) nebo se vzdušnou atmosférou po ukončení modifikace<sup>27</sup>.

Chemické vlastnosti povrchu a náboj vzorků byl analyzován i stanovením zeta potenciálu ( $\zeta$ ). Nemodifikovaný PLLA vykazoval  $\zeta = -65,7 \pm 0,5$  mV; pro PLLA modifikovaný plazmatem o výkonu 3 W po dobu 120 s bylo zjištěno  $\zeta = -65,1 \pm 0,1$  mV, což je v rámci experimentální chyby stejná hodnota. U PLLA modifikovaného plazmatem o výkonu 8 W po dobu 120 s došlo ke statisticky významné změně  $\zeta$  na hodnotu  $-58,3 \pm 0,1$  mV. Jak je patrné, nízký výkon plazmatu nemá na povrchový náboj výraznější vliv, zatímco plasma o vyšším výkonu vede k dramatictějších změnám povrchového chemismu i náboje. U nemodifikovaného PLLA je povrch tvořen pouze atomy v řetězci PLLA (tedy C a O). Po působení plazmatu dochází ke štěpení původních vazeb a tvorbě radikálů. Při reakci se vzduchem (přímo v aparatuře a/nebo po vyjmutí vzorku) dochází ke tvorbě kyslíkatých i dusíkatých polárních skupin. Malé změny chemického složení na povrchu vzorku nemusí být u stanovení pomocí XPS patrné, protože XPS

Tabulka I

Atomární koncentrace prvků (C, O a N) stanovená metodou XPS v původním PLLA a PLLA modifikovaném plazmatem při výkonu 3 a 8 W po dobu 50–300 s

Vzorek	Koncentrace prvků [at. %]		
	C (1s)	O (1s)	N (1s)
Nemodifikovaný PLLA	63,4	36,6	–
PLLA/ 3W 50 s	65,3	34,5	0,2
PLLA/ 3W 120 s	67,3	32,1	0,6
PLLA/ 3W 300 s	66,5	32,6	0,9
PLLA / 8W 50 s	64,8	35,1	0,1
PLLA/ 8W 120 s	64,4	34,8	0,8
PLLA/ 8W 300 s	68,3	30,8	0,9



Obr. 2. AFM skeny nemodifikovaného PLLA a PLLA modifikovaného plazmatem při výkonu 3 W po dobu 50 a 300 s. Hodnota drsnosti  $R_a$  reprezentuje aritmetický průměr odchylek od střední (nulové) plochy

analyzuje vrstvu o tloušťce cca 6–8 atomových vrstev, zatímco zeta potenciál je čistě povrchovou vlastností a indikuje tak i velmi malé změny „povrchové chemie“<sup>24,25,27,29</sup>.

#### Povrchová morfologie a drsnost

Vliv modifikace na povrchovou morfologii a drsnost vzorků byl stanoven pomocí AFM. Na obr. 2 jsou uvedeny skeny AFM a hodnoty drsnosti původního PLLA a PLLA modifikovaného plazmatem. Je zřejmé, že povrchová morfologie vzorků je, podle očekávání, silně závislá na době působení plazmatu. Krátká doba expozice PLLA vede ke vzniku malého množství krystalitů na povrchu vzorků. Se zvyšující se dobou expozice množství krystalitů výrazně narůstá a následně vede ke zvýšení povrchové drsnosti vzorků. V případě zvýšení výkonu došlo k mírné změně povrchové morfologie i mírnému zvýšení drsnosti. Tyto změny však nebyly tak výrazné jako v případě zvýšení doby expozice.

#### Cytokompatibilita a životaschopnost

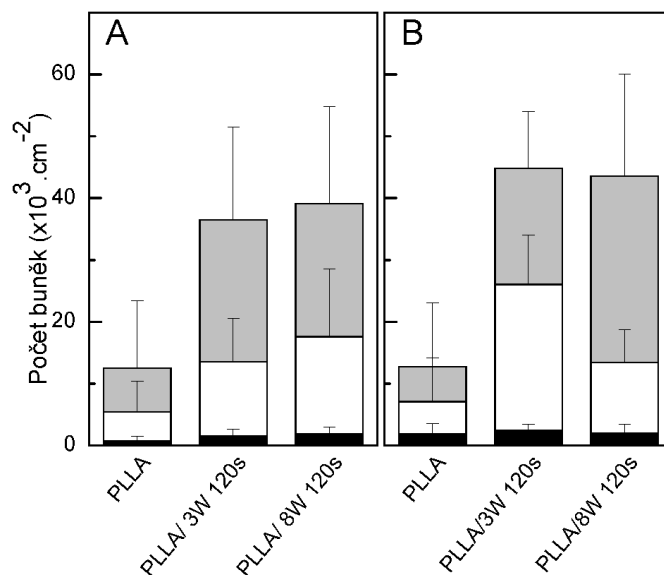
Experimenty byly prováděny se dvěma typy kmenových buněk – buňkami pocházejícími z tukové tkáně a získanými při (i) vyšším (ASC HP) a (ii) nižším tlaku (ASC LP). Na obr. 3A,B je uvedeno množství adherovaných (24 h od nasazení) a proliferovaných (96 a 168 h od nasazení ASC na vzorky). Z výsledků je patrné, že nemodifikovaný PLLA je pro kultivaci obou typů kmenových buněk nevhodný. Buňky kultivované na PLLA neměly správný fyziologický tvar a také jejich životaschopnost

byla nízká (cca 60–70 %). Na modifikovaných substrátech bylo zaznamenáno mírně vyšší množství adheřujících a výrazně vyšší množství proliferujících buněk, jejichž životaschopnost byla v rozmezí 89–96 %. Jak je patrné z obr. 4, buňky jsou také rovnoměrněji rozmístěny po celém povrchu substrátů. Rozdíl byl pozorován mezi oběma typy buněk. V případě kultivace ASC LP byly buňky rovnoměrněji rozmístěny po ploše substrátu, více rozprostřeny a měly svůj typický fyziologický tvar. Buňky rostly uspořádaně a v preferenčním směru. V případě kultivace ASC HP se na některých testovaných substrátech buňky naopak shlukovaly a vznikala místa, která nebyla buňkami pokryta; ve většině případů nebyla zaznamenána směrová orientace.

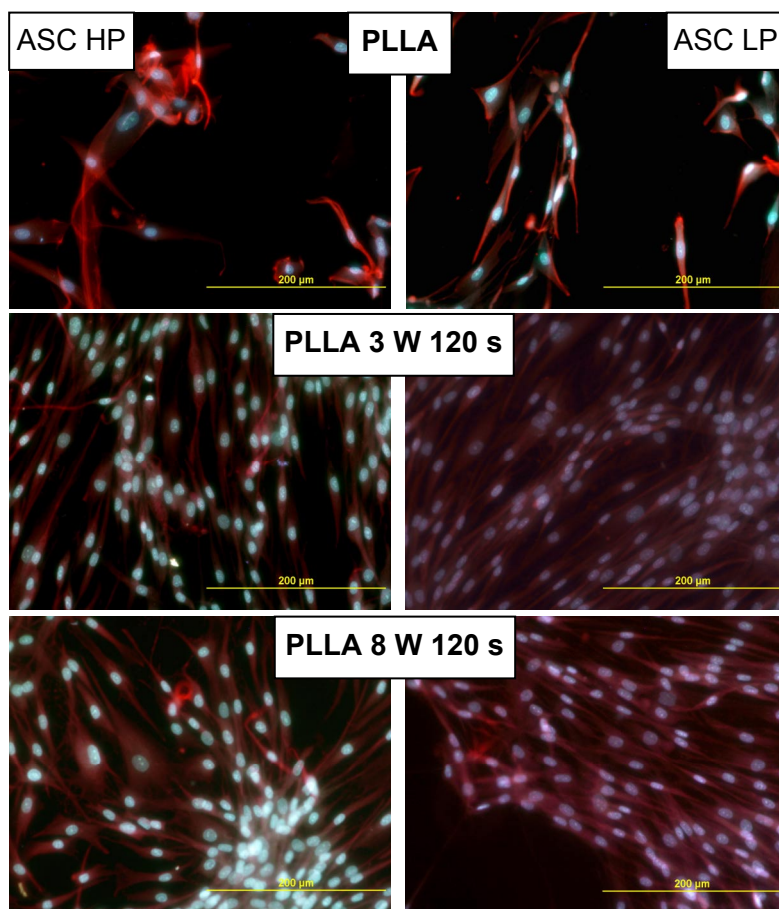
Tento experiment bude sloužit jako základ pro následující výzkum cílené diferenciaci kmenových buněk směřovaný ke konkrétnímu typu buněk (např. buňkám cévním či kostním).

#### Závěr

Bylo zjištěno, že použití plazmatické modifikace výrazně ovlivňuje povrchové vlastnosti filmu PLLA. Působením plazmatu dochází v závislosti na podmínkách modifikace k poklesu (krátká doba expozice) resp. růstu (dlouhá doba expozice) kontaktního úhlu PLLA. Modifikace plazmatem vede ke vzniku krystalitů na povrchu PLLA. S rostoucí dobou expozice množství krystalitů i drsnost povrchu vzorku roste. Zvýšením výkonu plazmatického záření dojde k mírnému nárůstu povrchové drsnosti a vzniku menšího množství krystalitů. Bylo zjištěno, že



Obr. 3. Adheze (24 hodin po nasazení) a proliferace (96 a 168 hodin po nasazení) kmenových buněk získaných z tukové tkáně při vyšším tlaku (A) a při nižším tlaku (B). Počet buněk kultivovaných po dobu 24 h je značen černou barvou, po dobu 96 h bílou barvou a po dobu 168 h šedou barvou



Obr. 4. Fotografie kmenových buněk z tukové tkáně (získané při vyšším ASC HP nebo při nižším tlaku ASC LP) proliferovaných (168 h po nasazení) na nemodifikovaném PLLA a PLLA modifikovaném v plazmatu (120 s při 3 a 8 W)

pro kultivaci kmenových buněk z tukové tkáně jsou vhodnější buňky získané při nižším tlaku. Tyto buňky byly rovnoměrněji rozmístěny po ploše testovaného substrátu, byly více rozprostřeny a měly svůj typický fyziologický tvar. Z experimentů je také patrné, že plazmatická modifikace výrazně zlepšuje možnost proliferace ASC.

*Autoři děkují za finanční podporu GA Ministerstva zdravotnictví ČR v projektu 15-33018A.*

#### LITERATURA

- Bačáková L., Mareš V., Bottone M. G., Pellicciari C., Lisá V., Švorčík V.: *J. Biomed. Mater. Res.* 49, 369 (2000).
- Bačáková L., Filová E., Rypáček F., Švorčík V., Starý V.: *Physiol. Res.* 53, 35 (2004).
- Santos M. I., Tuzlakoglu K., Fuchs S., Gomes M. E., Peters K., Unger R. E., Piskin E., Reis R. L., Kirkpatrick J.: *Biomaterials* 29, 4306 (2008).
- Wang A., Ao Q., Wei Y., Gong K., Liu X., Zhao N., Gong Y., Zhang X.: *Biotechnol. Lett.* 29, 1697 (2007).
- Sailaja G. S., Ramesh P., Kumary T. V., Varma H. K.: *Acta Biomaterialia* 2, 651 (2006).
- Montjovent M. O., Mark S., Mathieu L., Scaletta C., Scherberich A., Delabarde C., Zambelli P. Y., Bourbon P. E., Applegate L. H., Pioletti D. P.: *Bone* 42, 554 (2008).
- Hsieh C. Y., Tsai S. P., Wang D. M., Chang Y. N., Hsieh H. J.: *Biomaterials* 26, 5617 (2005).
- Svorčík V., Rybka V., Hnatowicz V., Smetana K.: *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 8, 435 (1997).
- Švorčík V., Hnatowicz V., Stopka P., Bačáková L., Heitz J., Öchsner R., Ryssel H.: *Rad. Phys. Chem.* 60, 89 (2001).
- Mikulíková R., Moritz S., Gumpenberger T., Olbrich M., Romanin C., Bacakova L., Svorcik V., Heitz J.: *Biomaterials* 26, 5572 (2005).
- Švorčík V., Hubáček T., Slepíčka P., Siegel J., Kolská Z., Blahová O., Macková A., Hnatowicz V.: *Carbon* 47, 1770 (2009).
- Švorčík V., Kasálková N., Slepíčka P., Záruba K., Král V., Bačáková L., Pařízek M., Lisá V., Ruml T.,

- Gbelcová H., Rimpelová S., Macková A.: Nucl. Instrum. Methods B 267, 1904 (2009).
13. Ročková K., Švorčík V., Bačáková L., Dvořánková B., Heitz J.: Nucl. Instrum. Meth. B 225, 275 (2004).
  14. Kotál V., Švorčík V., Slepíčka P., Sajdl P., Bláhová O., Šutta P., Hnatowicz V.: Plasma Process. Polym. 4, 69 (2007).
  15. Slepíčka P., Trostová S., Slepíčková Kasálková N., Kolská Z., Sajdl P., Švorčík V.: Plasma Process. Polym. 8, 197 (2012).
  16. Švorčík V., Kotál V., Siegel J., Sajdl P., Macková A., Hnatowicz V.: Polym. Degrad. Stab. 92, 1645 (2007).
  17. Švorčík V., Ročková K., Ratajová E., Heitz J., Dvořánková B.: Nucl. Instrum. Meth. B 217, 307 (2004).
  18. Kasálková N., Makajová Z., Slepíčka P., Kolářová K., Bačáková L., Pařízek M., Švorčík V.: J. Adhes. Sci. Technol. 24, 743 (2010).
  19. Slepíčka P., Slepíčková Kasálková N., Stránská E., Švorčík V.: Express Polym. Lett. 7, 535 (2013).
  20. Song K., Li L., Yan X., Zhang W., Zhang Y., Wang Y., Liu T.: Mater. Sci. Eng., C 70, 231 (2017).
  21. Zhang Y., Khan D., Dellling J., Tobiasch E.: Sci. World J. 2012, 1.
  22. Kokai L. E., Morra K., Rubin J. P.: Transl. Res. 163, 399 (2014).
  23. Ong W. K., Sugii S.: Int. J. Biochem. Cell Biol. 45, 1083 (2013).
  24. Kolská Z., Řezníčková A., Švorčík V.: e-Polymers, Article no. 083, 13 (2012).
  25. Kolská Z., Řezníčková A., Nagyová M., Slepíčková Kasálková N., Sajdl P., Slepíčka P., Švorčík V.: Polym. Degrad. Stab. 101, 1 (2014).
  26. Pařízek M., Kasalkova N., Bacakova L., Slepicka P., Lisa V., Blazkova M., Svorcik V.: Int. J. Mol. Sci. 10, 4352 (2009).
  27. Slepíčka P., Slepíčková Kasálková N., Siegel J., Kolská Z., Bačáková L., Švorčík V.: Biotechnol. Adv. 33, 1120 (2015).
  28. Slepíčková Kasálková N., Váchová K., Slepíčka P., Švorčík V.: Chem. Listy 110, 279 (2016).
  29. Švorčík V., Makajová Z., Kasálková-Slepíčková N., Kolská Z., Bačáková L.: J. Nanosci. Nanotechnol. 12, 6665 (2012).

**N. Slepíčková**, **Kasálková<sup>a</sup>**, **P. Slepíčka<sup>a</sup>**, **L. Bačáková<sup>b</sup>**, **Z. Kolská<sup>c</sup>**, and **V. Švorčík<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Solid State Engineering, University of Chemistry and Technology Prague*, <sup>b</sup>*Institute of Physiology, The Czech Academy of Science, Prague*, <sup>c</sup>*Faculty of Science, J. E. Purkyne University, Ústí nad Labem*): **Interaction of Stem Cells with Polymer Substrate**

This work is aimed on the determination of physico-chemical properties of plasma treated poly-L-lactic acid biopolymer and its influence on the attachment and organization of stem cells from fat tissue. The surface changes were examined with goniometry (wettability), atomic force microscopy (surface roughness and morphology) and photoelectron spectroscopy (chemical changes). The cytocompatibility of PLLA was studied *in vitro* by characterization of stem cell adhesion, growth, differentiation, migration and proliferation. The physico-chemical properties depend strongly on the plasma treatment time. It was found that plasma activation has a positive effect on stem cells cultivation, as well as on the cell growth in orderly manner and in the preferred direction.