

## Ионно-пучковая обработка поверхности ПДМС для улучшения клеточной адгезии

О.М. Марченко<sup>2,3,\*</sup>, А.П. Яковлев<sup>3</sup>, Д.К. Миннебаев<sup>1,2</sup>, Д.С.

Киреев<sup>1,2</sup>, Ю.В. Балакшин<sup>2</sup>, А.В. Назаров<sup>1,2</sup>, А.Д. Шпорин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, физический факультет  
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 2

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.В. Скобельцына  
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 2

<sup>3</sup>Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»  
Россия, 119049, Москва, Ленинский пр-кт, д. 4, стр. 1

(Поступила в редакцию 20.04.2023; подписана в печать 25.04.2023)

Объектом исследования являлись образцы полидиметилсилоксана Dow Corning Sylgard 184 (далее ПДМС) и клетки клеточной линии НЕК-293. В работе проводились эксперименты по модифицированию поверхности ПДМС пучками атомарных и кластерных ионов аргона с энергиями 10 кэВ. Ионные пучки направлялись под углами 60° и 90° к поверхности образцов, флюенс облучения составлял от 10<sup>15</sup> до 10<sup>16</sup> ион/см<sup>2</sup>. Исследование модифицированной поверхности проводилось методами атомно-силовой и оптической микроскопии. Исследование клеточной адгезии проводилось методами сканирующей ион-проводящей и оптической микроскопии. В результате исследования были получены результаты об улучшении условий для клеточной адгезии на поверхности ПДМС при предварительной обработке этой поверхности пучком атомарных ионов аргона, также получены данные об образующемся при ионном облучении микрорельефе на поверхности образцов.

PACS: 68.35.Np

УДК: 538.975

Ключевые слова: клеточная адгезия, модификация поверхности ионно-пучковыми методами, пучки кластерных ионов, атомно-силовая микроскопия.

### ВВЕДЕНИЕ

Адгезия биологических объектов на тех или иных поверхностях в высокой степени определяет применение материалов с данными поверхностными свойствами в различных областях науки и техники. Это сложный многоступенчатый процесс. Его характеристики зависят от множества факторов, в их числе: природа адгезирующихся биологических объектов; рельеф и физико-химические свойства, атомно-молекулярная структура поверхности, на которой происходит адгезия; внешние условия, такие как температура, состав окружающей среды, насыщенность ее питательными веществами и т.д. [1–3].

Свойства поверхности во многом определяют степень благоприятности условий жизнедеятельности для тех или иных биологических объектов, что в свою очередь определяет скорость их развития и роста, а также интенсивность взаимодействия живых объектов с окружающей средой [1–3]. В данной работе исследовалась адгезия клеток к поверхности полимера. Это сложное многоступенчатое взаимодействие поверхности твердой или гелеобразной, как в случае с ПДМС, фазы с адгезирующимися клетками и окружающей их средой на водной основе. Они включают в себя первоначальную адсорбцию молекул воды на уровне долей нанометров, последующую адсорбцию крупных биологических молекул, таких как белки и т.д. Посредством

этих и других процессов осуществляется совокупный процесс клеточной адгезии. Таким образом, изменения атомно-молекулярной структуры и морфологии на всех уровнях могут существенно повлиять на условия для жизнедеятельности данного типа клеток на исследуемой поверхности при заданных внешних условиях и неизменном составе окружающей жидкой среды.

Существует большое количество способов модификации поверхности [4], в их числе механические методы (шлифовка), травление (химическое или плазменное), осаждение из раствора и др. Ионно-пучковая обработка поверхности образца выделяется среди всех других методов [5, 6], т.к. позволяет реализовывать широкий спектр изменений в образце, варьируя большое число параметров: тип ионов, их энергию, флюенс, ток пучка и угол падения на поверхность. В данной работе модифицирование проводилось пучками кластерных и атомарных ионов аргона с энергиями до 10 кэВ.

В данной работе исследовалась клеточная адгезия клеточной линии НЕК-293 — клеток эмбриональных почек человека, трансформированных аденовирусом [7]. Данная клеточная линия была выбрана в качестве модельного биологического объекта в связи с простотой культивирования и относительно высокой способностью некоторое время выживать при неблагоприятных внешних условиях. Одним из показателей благоприятных для жизнедеятельности адгезировавшихся клеток являются их механические свойства, такие как модуль Юнга. Измерением механических свойств клеток получают данные об их текущем состоянии, эти данные также могут использоваться для идентификации типа исследуемой клетки. К примеру, зло-

\* oleg.marchenko.99@bk.ru

качественные раковые клетки в ряде случаев проявляют меньшую жесткость относительно здоровых клеток [8].

## 1. МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для проведения исследования был изготовлен ряд образцов из ПДМС Dow Corning Sylgard 184, представляющих собой таблетки высотой до трех миллиметров и диаметром до восьми миллиметров.

Облучение атомарными и кластерными ионами производилось на ускорительном комплексе МГУ [9–11], при этом:

1. температура столика с образцами составляла  $(20-25)^\circ\text{C}$ ;
2. давление в камере составляло  $10^{-6} - 10^{-7}$  мбар;
3. энергия ионов — 10 кэВ;
4. флюенс облучения варьировался в диапазоне от  $10^{15}$  до  $10^{16}$  ион/см<sup>2</sup>;
5. число атомов в кластере до  $10^4$ ;

Для контроля топографии поверхности применялся метод полуконтактной атомно-силовой микроскопии [12]. Измерения проводились на эталонном образце, для определения исходного рельефа поверхности до ионно-пучковой обработки, и для каждого из облученных образцов. Кроме того, для контроля изменений применялась оптическая микроскопия.

Для исследования адгезии и механических свойств адгезировавшихся клеток применялся сканирующий ион-проводящий микроскоп с конфокальным модулем (уникальная научная установка — УНУ) лаборатории биофизики НИТУ МИСИС. С помощью метода сканирующей ион-проводящей микроскопии были получены данные о механических свойствах адгезировавшихся клеток. На один эталонный и один модифицированный образец сажали клетки клеточной линии НЕК-293, заливали чашку Петри питательным раствором, и оставляли в инкубаторе при температуре  $36.6^\circ\text{C}$  не менее чем на одни сутки. По истечении этого времени образцы с адгезировавшимися клетками извлекались из инкубатора и проводились исследования адгезии и механических свойств клеток на поверхности контрольного и облученного образцов.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам, полученным в работе [13], облучение поверхности ПДМС ускоренными атомарными ионами Fe, Ni, Co и Eu с энергией 45 кэВ приводило к формированию на поверхности специфического рельефа, представляющего собой домены «вспучивания»,

вызванные деформацией. Кроме того, с увеличением флюенса имплантации увеличивалось количество V-образных трещин, вызванных напряжениями деформаций. Изображение данного рельефа, полученное в работе [13], приведено на рис. 1. При бомбардировке поверхности образца ионным пучком, на поверхности может происходить ряд принципиально различных процессов, среди них рассеяние падающих ионов, выбивание электронов и атомов (распыление) с поверхности мишени, возникновение радиационно-индуцированных дефектов, к которым также можно отнести появление примесных атомов [14, 15]. Такая картина характерна для кристаллических материалов, взаимодействие ускоренных ионов с полимерами изучалось значительно меньше и в этой связи вызывает научный интерес.

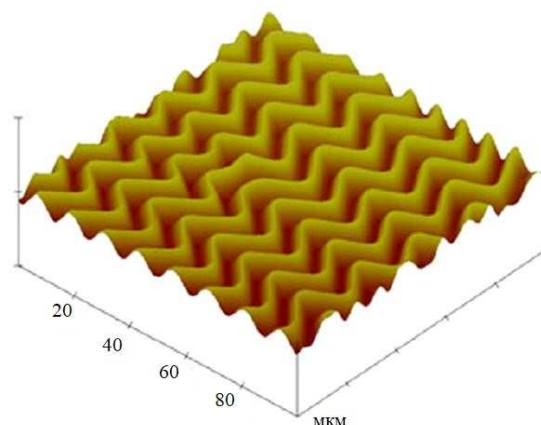


Рис. 1. АСМ изображение облученной металлическими ионами поверхности ПДМС [13]

Для клеток линии НЕК-293 известны механические свойства для различных случаев внешних контактов [16]. Результаты измерения модуля Юнга для клеток НЕК-293 в адгезированном и суспендированном состояниях при обработке различными веществами, способными быть агентами, ускоряющими и провоцирующими развитие опухолей, приведены в работе [16]. Существуют табличные данные для механических свойств различных типов клеток в зависимости от внешних и внутренних факторов. По отклонениям измеренных значений от литературных данных можно судить о состоянии клеток на данной подложке при данных внешних условиях.

Результаты исследования поверхности изучаемых необлученных образцов представлены на рис. 1. Среднеквадратичное отклонение распределения высот составляет не более 3 нм.

Для образца, облученного атомарными ионами аргона с энергией 10 кэВ по нормали к поверхности, с флюенсом  $10^{16}$  ион/см<sup>2</sup> характерный рельеф приведен на рис. 3. Наблюдалось образование доменной структуры «вспучивания», неупорядоченный характерный волнообразный рельеф (ripples), средний перепад

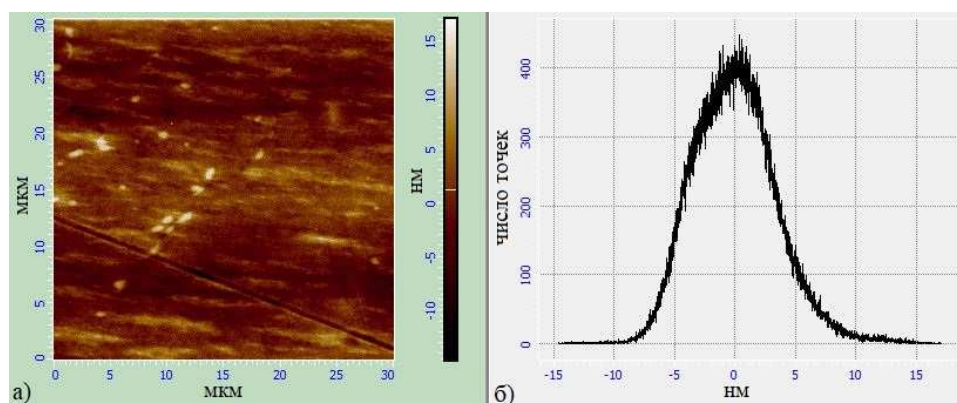


Рис. 2. АСМ изображение поверхности необлученного образца (а) и распределение высот (б)

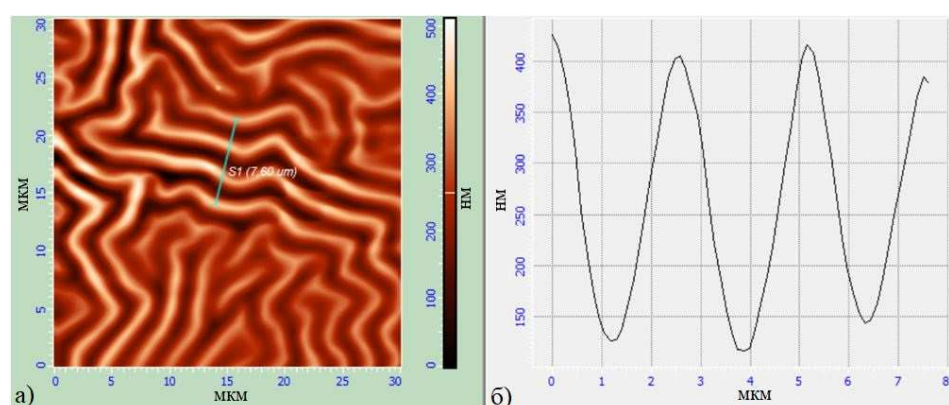


Рис. 3. АСМ изображение поверхности облученного по нормали образца (а) и профиль рельефа (б)

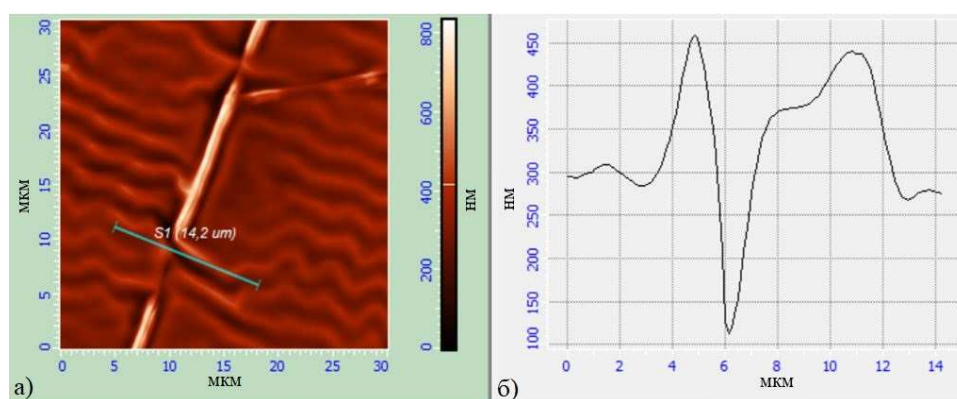


Рис. 4. АСМ изображение трещины на облученном по нормали образце (а) и её профиль (б)

высот порядка 200 нм, длины «волн» порядка 2.5 мкм. Кроме того, АСМ исследование показало, что при воздействии ионного пучка на поверхности образца образуются характерные трещины, вызванные напряжениями. Это хорошо согласуется с данными источников [13, 17, 18]. Изображение такой трещины приведено на рис. 4. Для этого образца на этапе исследования адгезии не было выявлено каких-либо существенных отличий от контрольного. Это можно связать с высокой

гидрофобностью и неупорядоченностью получившейся структуры.

Образец, облучение которого проводилось кластерными ионами аргона энергией 10 кэВ, флюенс облучения составила  $3 \times 10^{15}$  ион/см<sup>2</sup>, исследовался с помощью сканирующей электронной микроскопии, АСМ, а также описанным выше методом исследования клеточной адгезии не выявили отличий исследуемых свойств от таковых на контрольном образце.

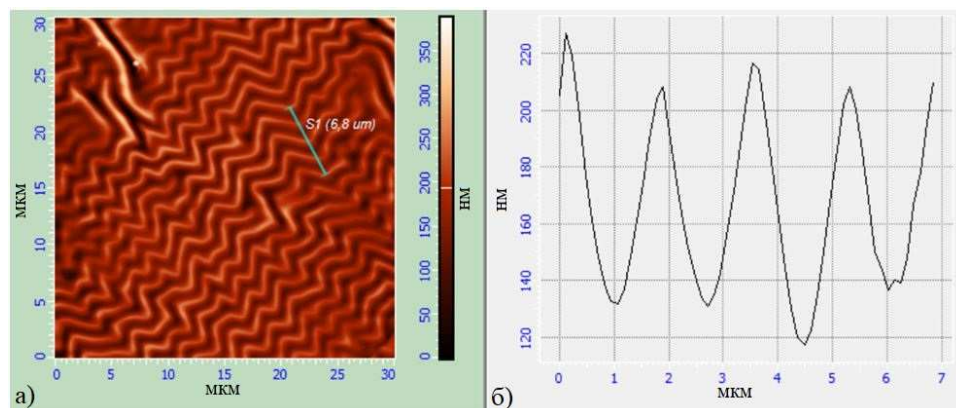


Рис. 5. АСМ изображение поверхности облученного под углом образца и профиль рельефа

Для образца, облученного атомарными ионами аргона с энергией 10 кэВ под углом  $60^\circ$  к поверхности, с флюенсом, как и в первом случае,  $10^{16}$  ион/см<sup>2</sup> характерные виды рельефа приведены на рис. 5. Как и в предыдущем случае, наблюдалось образование доменной структуры «вспучивания», упорядоченный волнообразный рельеф, средний перепад высот порядка 100 нм, длины «волн» порядка 1.6 мкм.

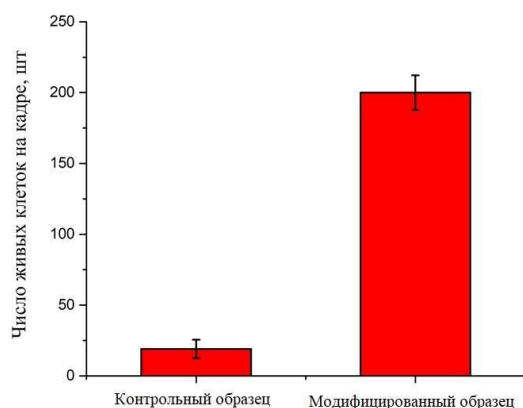


Рис. 6. Гистограмма, показывающая число живых клеток в кадре для контрольного образца (слева) и для образца, облученного под углом к поверхности (справа)

Меньший размер характерных элементов рельефа и большая, по сравнению с облученным по нормали образцом, его упорядоченность, судя по всему, привели к принципиально отличным результатам при измерении адгезии. На рис. 6 приведена гистограмма, показывающая количество адгезировавшихся клеток, попавших в поле зрения микроскопа для контрольного и облученного образца. Увеличение числа клеток почти на порядок свидетельствует о резком улучшении условий для адгезии.

Кроме того, исследование механических свойств клеток также показали, что их модуль Юнга на облу-

ченном образце ниже, чем на контрольном. Для клеток линии НЕК-293 нормальные значения модуля Юнга в адгезированном состоянии составляют порядка 5 КПа [16]. Измеренные значения для клеток на поверхности контрольного образца превышают это значение минимум вдвое. Для модифицированного образца же эти значения значительно ниже, что свидетельствует о лучших условиях для адгезии и жизнедеятельности для данного типа клеток на обработанной таким образом поверхности. Результаты измерения модуля Юнга для контрольного и облученного образцов приведены на рис. 7.

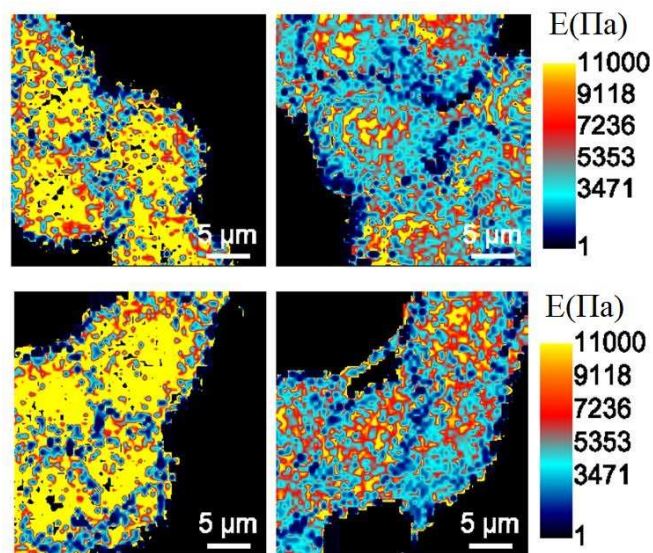


Рис. 7. Топография модуля Юнга для клеток на кадре для контрольного образца (слева) и для образца, облученного под углом к поверхности (справа)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных экспериментальных данных по клеточной адгезии на контрольных образцах, и образцах, подверженных ионно-пучковой обработке позволяет сделать вывод о существовании принципиальной возможности добиться увеличения числа адгезированных клеток. В совокупности с полученными данными о разности в механических свойствах клеток на модифицированном и немодифицированном образцах позволяет сделать вывод о том, что методами ионно-пучковой обработки поверхности полимера можно улучшить условия для жизнедеятельности клеток на данной поверхности.

Это можно связать с рядом факторов, в т.ч.:

изменение рельефа поверхности, изменение атомно-молекулярной структуры поверхности, механических свойств и т.д. Однако, из опыта видно, что адгезия на гидрофобной поверхности с неупорядоченным рельефом мало отличается от таковой на контрольном необлученном образце. Это можно объяснить конкуренцией различных факторов - высокая гидрофобность уменьшает клеточную адгезию, в то время как более развитый рельеф, более подходящие для жизни клеток атомно-молекулярная структура и механические свойства её увеличивают.

Это исследование было проведено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-72-10118), при выполнении работы было использовано оборудование «Ускорительного комплекса МГУ».

- [1] Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. *Biomaterials—an Introduction into Materials in Medicine*. Academic Press, San Diego, 1996.
- [2] Ruoslahti E., Pierschbacher M.D. // *Science*. **238**. 491. (1987).
- [3] Tirrell M., Kokkoli E., Biesalski M. // *Surface Science*. **500**, Iss. 1–3. 61. (2002).
- [4] Табаков В.П. Методы поверхностной модификации и нанесения покрытий. Ульяновск, 2015.
- [5] Бундюкова В.Д., Якимчук Д.В., Каниюков Е.Ю. и др. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физ. Астрон.* № 3. 30. (2020). (Bundyukova V.D., Yakimchuk D.V., Kaniukov E.Y. et al. *Moscow Univ. Phys. Bull.* **75**. 225. (2020).)
- [6] Шемухин А.А., Смирнов А.М., Евсеев А.П. и др. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физ. Астрон.* № 2. 21. (2020). (Shemukhin A.A., Smirnov A.M., Evseev A.P. et al. *Moscow Univ. Phys. Bull.* **75**. 133. (2020))
- [7] Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. // *Gen. Virology*. **1**. 59. (1977).
- [8] Cross S.E., Jin Y.S., Rao J., Gimzewski J.K. // *Nature Nanotechnology*. **2**. 780. (2007).
- [9] Шемухин А.А., Черных П.Н., Черныш В.С. // *Прикладная физика*. **5**. 59. (2013).
- [10] Киреев Д.С., Данилов А.В., Иешкин А.Е., Черныш В.С. // *Вестник РГРТУ*. N 66. 40. (2018).
- [11] Иешкин А.Е., Ермаков Ю.А., Черныш В.С. // *Письма в ЖТФ*. **41**, N 22. 8. (2015).
- [12] Vlassov S., Oras S., Antsov M. // *Rev. Adv. Mater. Sci.* N 56. 62. (2018).
- [13] Winton B.R., Ionescu M., Dou S.X. // *Acta Materialia*. N 5. 1861. (2010).
- [14] Balakshin Yu.V., Shemukhin A.A., Nazarov A.V. // *Technical Physics*. **63**, N 12. 1861. (2018).
- [15] Мерзук Б., Миннебаев Д.К., Шемухин А.А., Балакшин Ю.В. // *Ученые записки физического ф-та Московского ун-та*. N 2. 1920404. (2019).
- [16] Haghparast S.M.A., Kihara T., Miyake J. *Distinct mechanical behavior of HEK293 cells in adherent and suspended states*. *Peer J* 3:e1131. (2015).
- [17] Winton Brad R. Low energy metal ion implantation of poly-di-methylsiloxane (PDMS) for increased biocompatibility for use in tissue engineering applications. Doctor of Philosophy thesis. University of Wollongong. Institute for Superconducting and Electronic Materials, University of Wollongong, 2010.
- [18] Ionescu M., Winton B., Wexler D. // *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B. Beam Interact. Mater. Atoms*. **273** 161. (2012).

## Ion-beam surface treatment of PDMS to improve cell adhesion

O.M. Marchenko<sup>2,3,a</sup>, A.P. Yakovlev<sup>3</sup>, D.K. Minnebaev<sup>1,2</sup>, D.S. Kireev<sup>1,2</sup>, Yu.V. Balakshin<sup>2</sup>, A.V. Nazarov<sup>1,2</sup>, A.D. Shporin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia

<sup>2</sup>Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia

<sup>3</sup>NUST MISIS. Moscow 119049, Russia

E-mail: <sup>a</sup>oleg.marchenko.99@bk.ru

The object of the study were samples of pure polydimethylsiloxane (hereinafter PDMS) and cells of the HEK-293 cell line. Experiments were carried out to modify the PDMS surface with beams of atomic and cluster argon ions with energies of 10 keV. Ion beams were directed at angles of 60 and 90 to the surface of the samples, the radiation fluence ranged from  $10^{15}$  to  $10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>. The modified surface was studied by atomic force and optical microscopy methods. The study of cell adhesion was carried out by scanning ion-conducting and optical microscopy. As a result of

the study, improving of the conditions for cell adhesion on the surface of PDMS during pretreatment of this surface with a beam of atomic argon ions was demonstrated, and the formation of the microrelief during ion irradiation on the surface of the samples was observed.

PACS: 68.35.Np.

*Keywords:* cell adhesion, ion beams, cluster ion beams, atomic force microscopy.

*Received 24 April 2023.*

#### **Сведения об авторах**

1. Марченко Олег Михайлович — инженер 1-кат. НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына, студент НИТУ «МИСиС»; тел.: (495) 939-37-70, e-mail: oleg.marchenko.99@bk.ru.
2. Яковлев Алексей Павлович — инженер научного проекта НИТУ МИСиС; e-mail: iakovlev.ap@misis.ru.
3. Миннебаев Дамир Кашифович — гл. инженер ускорителя НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына, инженер Физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова; e-mail: minnebaev.dk17@physics.msu.ru.
4. Киреев Дмитрий Сергеевич — канд. физ.-мат. наук, вед. инженер, программист НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына; e-mail: minnebaev.dk17@physics.msu.ru.
5. Балакшин Юрий Викторович — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына; e-mail: balakshiny@gmail.com.
6. Назаров Антон Викторович — науч. сотрудник НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына; e-mail: av.nazarov@physics.msu.ru.
7. Шпорин Артем Дмитриевич — программист 1-кат. НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына, аспирант Физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова; e-mail: shporin.ad16@physics.msu.ru.