

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

PROLIFERACE BUNĚK NA VODIVÉM POLYMERU, POLYANILINU

PETR HUMPOLÍČEK^{a,b}, VĚRA KAŠPÁRKOVÁ^{a,c},
JAROSLAV STEJSKAL^d, ZDENKA KUČEKOVÁ^{a,b}
a PETRA ŠEVČÍKOVÁ^c

^a Centrum polymerních systémů, Univerzitní institut, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Nad Ovčímou 3685, 760 01 Zlín, ^b Centrum polymerních materiálů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, ^c Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 275, 760 01 Zlín, ^d Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6
humpolicek@ft.utb.cz, vkasparkova@ft.utb.cz

Došlo 6.6.11, přijato 31.8.11.

Klíčová slova: polyanilin, proliferace, lidské jaterní buňky

Úvod

V posledním desetiletí došlo k výraznému rozvoji znalostí o vodivých polymerech a tím i k jejich rozšíření do praktických aplikací. Elektrická vodivost těchto polymerů se pohybuje v rozmezí 0,01–30 S cm⁻¹ a je srovnatelná s vodivostí anorganických polovodivých materiálů. Mezi nejčastěji studované vodivé polymery patří polypyrrol, polyacetylen a polyanilin. Polyanilin může běžně existovat v několika formách, které se navzájem liší stupněm oxidace nebo protonace¹. Nejběžnějšími formami jsou zeleně zbarvená vodivá polyanilinová (emeraldinová) sůl a nevodivá modrá báze (Schéma 1). K přechodu mezi těmito dvěma formami dochází při pH 5–6 a vodivost polyanilinu tímto přechodem klesá z jednotek S cm⁻¹ na 10⁻⁹ S cm⁻¹. Obě uvedené formy se liší nejen z hlediska elektrických vlastností, ale odlišují se i svým chováním při kontaktu s živými organismy, tkáněmi či jednotlivými buňkami. Polyanilin je jedním z vodivých polymerů, pro něž se hledalo využití především s ohledem na jejich schopnost reagovat změnou elektrické vodivosti na vnější stimuly. Tato schopnost vedla k jeho aplikacím v oblasti senzorů², antikoročních nátěrů³, katalýzy organických reakcí⁴ či palivových článků⁵.

Velmi zajímavé a slibné je využití polyanilinu v biomedicínských aplikacích. V této oblasti se výzkum

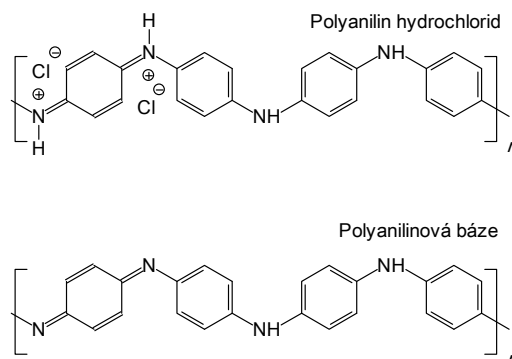


Schéma 1. Vodivá polyanilinová sůl a nevodivá polyanilinová báze

a vývoj soustřeďuje především na jeho uplatnění v regeneraci srdeční⁶ či nervové tkáně⁷. Nevýhodou dosud publikovaných prací zabývajících se biomedicínskými aplikacemi polyanilinu je skutečnost, že se většinou zaměřují na sledování vlastností polyanilinových kompozitů a nikoliv polyanilinu samotného. To je výhodné z hlediska konkrétních aplikací či výrobků, ale zároveň je tím výsledek práce omezen vždy jen na daný, konkrétní systém bez možnosti zobecnění výsledků pro ostatní aplikace. Nejčastěji studovanými materiály jsou kompozity polyanilinu s poly-L-lysinem⁶, s poly(L-laktidem-co-ε-kaprolaktonem)⁸ nebo želatinou⁹.

Cílem této práce bylo studium metodiky testování vazby a proliferace lidských buněk na povrchy filmů připravených z „čistého“ polyanilinu jak z jeho vodivé, tak i nevodivé varianty.

Experimentální část

Příprava polyanilinových filmů

Při přípravě polyanilinových filmů pro testování proliferace buněk bylo využito schopnosti vodné reakční směsi používané pro oxidaci anilinu vytvářet film o submikrometrové tloušťce na povrchích substrátů, které jsou do této reakční směsi ponořeny¹⁰. Tvorba filmu probíhala *in situ* přímo v polystyrenových kultivačních miskách (TPP, Switzerland). Anilin hydrochlorid byl rozpuštěn ve vodě a smíchán se stejným objemem vodného roztoku peroxodisíranu amonného; koncentrace obou látek ve výsledné směsi byla 0,2 mol l⁻¹ a 0,25 mol l⁻¹ (cit.¹⁰). Vzniklá směs byla nalita do kultivačních misek. Reakce probíhala při laboratorní teplotě a byla ukončena

po 10 min, kdy na polystyrenovém povrchu narostl zelený film vodivé polyanilinové soli. Jednotlivé misky byly vypláchnuty $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ roztokem kyseliny chlorovodíkové k odstranění sraženiny polyanilinu na povrchu filmu, poté methanolem a následně byly vysušeny na vzduchu. Výsledný film má globulární morfologii¹⁰ a tloušťku kolem 100 nm. Vodivý film polyanilinové soli (hydrochloridu), byl v 50 % experimentů převeden na modrou, nevodivou polyanilinovou bázi působením 1 M roztoku hydroxidu amonného.

Studium růstu buněk

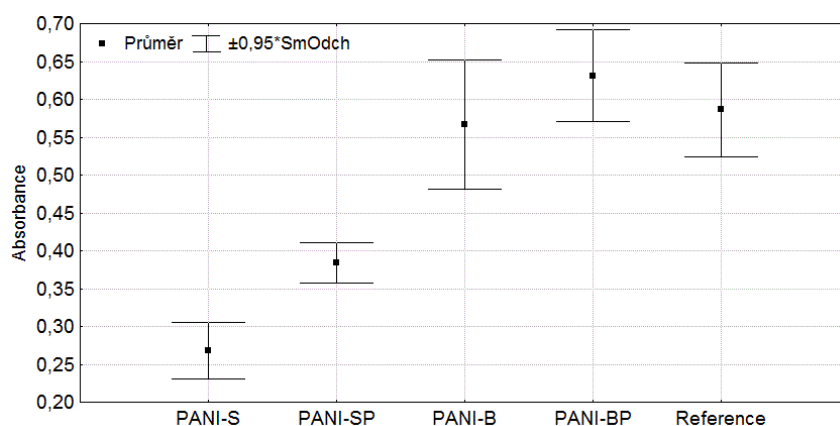
V této práci byla použita buněčná linie HepG2 od firmy ATCC (HB-8065). Jedná se o linii lidských hepatocelulárních buněk pocházejících z karcinomu jater. Kultivační podmínky byly následující: jako kultivační médium bylo použito Eagle's Minimum Essential Medium od firmy ATCC doplněné fetálním bovinním sérem v poměru 1:10. Dále bylo do 550 ml média přidáno 5 ml 2 mM L-glutaminu a 2 ml gentamycinu o koncentraci $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (PAA Laboratories GmbH, Austria). Buňky byly kultivovány v inkubátoru HeraCell 150i (Thermo Scientific, USA) při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v 5% atmosféře CO_2 . Práce byly prováděny v laminárním boxu II. třídy HERAsafe KSP (Thermo Electron LED GmbH, Německo).

Vzorky filmů byly před vlastním testem rozděleny do 4 skupin. První skupinu tvořily polyanilinové filmy soli polyanilinu (PANI-S), druhou skupinu představovaly filmy polyanilinových bází (PANI-B), třetí a čtvrtá skupina odpovídaly filmům polyanilinové soli a báze, které byly před začátkem testu po dobu 30 min ponořeny do „ultračisté“ vody (Simplicity, Millipore, USA). Tyto vzorky jsou dále označovány jako PANI-SP a PANI-BP. Buňky byly na připravené povrchy nanášeny v koncentraci $1 \cdot 10^5$ buněk v 1 ml a následně kultivovány po dobu 3 dnů. Schopnost buněk přichytit se na povrch daného filmu a

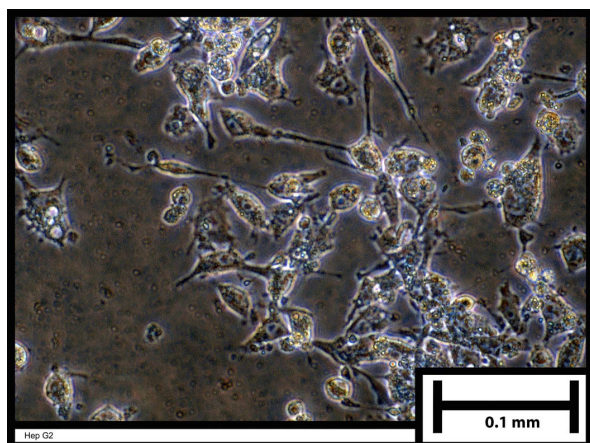
jejich morfologické charakteristiky byly stanoveny pomocí invertovaného mikroskopu s fázovým kontrastem CKX41 (Olympus, Japan). Ke stanovení počtu buněk, které narostly za dobu tří dnů, byla využita kolorimetrická metoda MTT, vyhodnocená na přístroji Sunrise Elisa Reader (Tecan, Switzerland). Statistická průkaznost rozdílů mezi počtem buněk uchycených na jednotlivých typech polyanilinových filmů byla stanovena *t*-testem.

Výsledky a diskuse

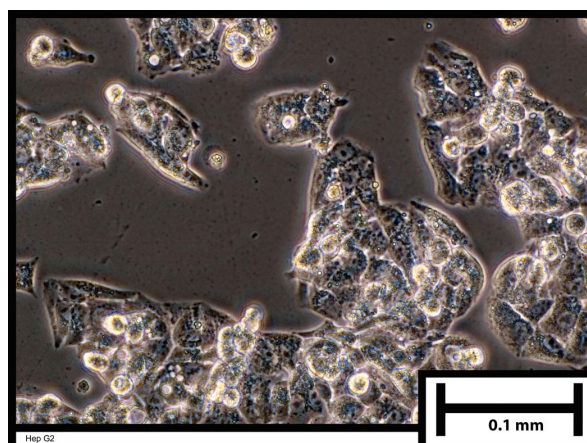
Z obr. 1 je patrné, že na všech čtyřech typech sledovaných povrchů PANI vzorků se buňky dokázaly bez obtíží „přichytit“ a následně růst. Tento výsledek je v souladu s dříve publikovanými pracemi¹¹, které prokázaly, že povrchy pokryté filmy polyanilinu umožňují bezproblémovou adhezi buněk. Z obr. 2 je však také zřejmé, že ve srovnání s kontrolním vzorkem (obr. 3), kde buňky rostly na tkáňovém polystyrenu běžně užívaném pro kultivace buněk, došlo ke změně jejich morfologie. Ze srovnání je patrné, že buňky ztrácely svůj typický tvar, ohraničení buněk bylo méně jasné a zároveň vznikalo více ektooplazmatických výběžků, pseudopodií. Schopnost buněk přichytit se a růst na polymerních površích je dána především hydrofilitou či hydrofobicitou povrchu, která souvisí s volnou povrchovou energií a charakteristickými funkčními skupinami na povrchu filmů. Pozorovaná vazba a růst buněk na povrchu polyanilinu jsou tedy podmíněny jeho hydrofilitou¹². I když je polyanilin hydrochlorid podstatně hydrofilnější než polyanilinová báze, jak potvrzují měření kontaktních úhlů¹³, zjištěný rozdíl adhezi buněk na sledované povrchy neovlivnil. Kromě hydrofility povrchu je proces buněčné adheze rovněž ovlivněn fyzikálními, povrchovými vlastnostmi, např. zrnitostí, topografií nebo rigiditou. V případě sledovaných polyanilinových filmů však podstatné rozdíly v kvalitě



Obr. 1. Průměrná absorbance kvantifikující hustotu buněk na sledovaných filmech připravených ze vzorků polyanilinu a její směrodatná odchylka; PANI-S – polyanilinová sůl, PANI-SP – upravená polyanilinová sůl, PANI-B – polyanilinová báze, PANI-BP – upravená polyanilinová báze, reference – tkáňový polystyren



Obr. 2. Morfologie buněk rostoucích na filmu tvořeném poly-anilínovou bází



Obr. 3. Morfologie buněk referenčního vzorku – růst na tkáňovém polystyrenu

povrchu pozorovány nebyly.

Zatímco výsledky získané studiem vazby buněk na povrchy připravené z polyanilinu jsou v souladu s očekáváním i s výsledky publikovanými jinými autory, výsledky studie zaměřené na sledování proliferace buněk na studovaných filmech jsou nové a překvapivé. Oproti očekávání byly detegovány rozdíly v proliferaci buněk na jednotlivých typech filmů: ochota buněk růst na daném filmu se významně lišila a závisela na tom, zda se jednalo o film připravený z polyanilínové soli, báze či o filmy, které byly upraveny opláchnutím „ultračistou“ vodou.

Film připravený z vodivé polyanilínové soli (PANI-S), která má nejvyšší potenciál pro praktické použití, vykazuje ze všech testovaných filmů nejnižší schopnost proliferace buněk. Naopak, proliferace zaznamenaná na povrchu pokrytém polyanilínovou bází (PANI-B) byla statisticky významně vyšší. Nejvyšší proliferace byla pozorována na povrchu upraveného, ultračistou vodou opláchnutého filmu polyanilínové báze (PANI-BP). Také v případě povrchu

tvořeného upravenou polyanilínovou solí (PANI-SP) byla pozorována ve srovnání s původním, neupraveným filmem vyšší proliferace buněk. To lze vysvětlit tím, že vlivem působení ultračisté vody dochází nejen k odstranění nečistot, ale i k postupné deprotonaci tenkého filmu polyanilínové soli naneseného na nosiči a jeho přeměně na film tvořený převážně polyanilínovou bází. Výsledná proliferace na povrchu upraveného PANI-SP je tedy jen velmi obtížně srovnatelná s proliferací detegovanou na původním povrchu PANI-P. Jednotlivé výsledky vyjadřující schopnost buněk růst na sledovaných površích jsou patrné z obr. 1, který znázorňuje hodnoty absorbance MTT. Výše uvedené rozdíly byly potvrzeny také matematicko-statistickým zpracováním. Mezi schopností povrchů PANI-S a PANI-SP stimulovat proliferaci buněk byl detegován průkazný rozdíl. Statisticky průkazný byl pak i rozdíl mezi PANI-S a PANI-SP oproti PANI-B, PANI-BP a kontrolnímu vzorku. Mezi PANI-B a PANI-BP pak nebyly detegovány žádné statisticky významné

Tabulka I

Hodnoty proliferace dle MTT testu stanovené na jednotlivých površích a jejich statisticky průkazné rozdíly

| Povrch ^a | Průměr | Směrodatná chyba průměru | Směrodatná odchylka | Minimum | Maximum |
|------------------------|--------|--------------------------|---------------------|---------|---------|
| PANI-S ^A | 0,2678 | 0,0065 | 0,0389 | 0,1780 | 0,3240 |
| PANI-SP ^B | 0,3839 | 0,0047 | 0,0283 | 0,3020 | 0,4310 |
| PANI-B ^C | 0,5673 | 0,0150 | 0,0899 | 0,4270 | 0,7410 |
| PANI-BP ^C | 0,6314 | 0,0107 | 0,0640 | 0,5250 | 0,7340 |
| Reference ^C | 0,5862 | 0,0132 | 0,0649 | 0,4360 | 0,7680 |

^a Statisticky průkazné rozdíly jsou vyznačeny pomocí indexů. Rozdílné indexy ve sloupci 1 značí statisticky průkazný rozdíl $P \leq 0,05$ mezi příslušnými vzorky. PANI-S – polyanilínová sůl, PANI-SP – upravená polyanilínová sůl, PANI-B – polyanilínová báze, PANI-BP – upravená polyanilínová báze; Reference – tkáňový polystyren

rozdíly, stejně jako mezi těmito dvěma vzorky a vzorkem referenčním. Výsledky ukázaly, že povrch filmu z PANI-BP vykázal v průměru vyšší proliferaci buněk, než referenční polystyrenový povrch. Tento rozdíl je však statisticky neprůkazný.

Podrobné výsledky statistického zpracování jsou uvedeny v tab. I. Z prezentovaných výsledků vyplývá, že vodivá polyanilinová sůl stimuluje proliferaci buněk méně, než polyanilinová báze. Procesem úpravy pak dochází ke zlepšení proliferace. To může být způsobeno jednak odstraněním potenciálně toxických nečistot a v případě filmu polyanilinové soli také její částečnou deprotonací a přeměnou na polyanilinovou bázi, která vykazuje „příznivější“ biologické vlastnosti. V průběhu konverze polyanilinu hydrochloridu na polyanilinovou bázi dochází též k odstranění kyseliny chlorovodíkové, resp. chloridových protiontů (Schéma I), což rovněž může vést ke zlepšení atraktivitu polyanilinových povrchů pro buňky. Použití různých polyanilinových solí, např. síranu, dusičnanu nebo fosforečnanu, by mohlo poskytnout odpověď na otázku, do jaké míry jednotlivé protionty odpovídají za interakci buněk s povrchem substrátu.

Závěr

Výsledky studie zaměřené na sledování schopnosti lidských jaterních buněk přichytit se na povrchy připravené z vodivé polyanilinové soli i nevodivé polyanilinové báze potvrdily, že se sledované buňky váží na oba studované filmy. Následná proliferace buněk na sledovaných filmech ukázala statisticky průkazné rozdíly ve schopnosti buněk růst v závislosti na typu polyanilinového filmu a jeho následné úpravě. Z provedených testů je zřejmé, že vodivá polyanilinová sůl je pro růst buněk nejméně příznivá, což limituje její praktické biomedicínské využití bez dalšího studia procesu přečištění, případně dalších úprav. Navazující výzkum bude orientován na sledování elektrické vodivosti polyanilinu při interakci s živou hmotou.

Tento článek byl vytvořen za podpory Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace, jenž je spolufinancován Evropským fondem regionálního rozvoje (ERDF) a státním rozpočtem ČR, v rámci projektu Centrum polymerních systémů (CZ.1.05/2.1.00/03.0111). Spoluautorka Z. Kuceková děkuje za podporu internímu grantu UTB ve Zlíně č. IGA/20/FT/11/D a spoluautorka P. Ševčíková děkuje za podporu internímu grantu UTB ve Zlíně č. IGA/15/FT//D, které jsou oba financované z prostředků specifického vysokoškolského výzkumu.

LITERATURA

1. Stejskal J., Kratochvíl P., Jenkins A. D.: *Polymer* 37, 367 (1996).
2. Airoudj A., Debarnot D., Bêche B., Poncin-Epaillard F.: *Talanta* 77, 1590 (2009).
3. Kalendová A., Veselý D., Sapurina I., Stejskal J.: *Prog. Org. Coat.* 63, 228 (2008).
4. Drelinkiewicz A., Zieba A., Sobczak J. W., Bonarowska M., Karpinski Z., Waksmundzka-Góra A., Stejskal J.: *React. Funct. Polym.* 69, 630 (2009).
5. Wang Y., Tran H. D., Kaner R. B.: *J. Phys. Chem. C* 113, 10346 (2009).
6. Fernandes E. G. R., Zucolotto V., De Queiroz A. A.: *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.* 47, 1203 (2010).
7. McKeon K. D., Lewis A., Freeman J. W.: *J. Appl. Polym. Sci.* 115, 1566 (2010).
8. Jeong S. I., Jun I. D., Choi M. J., Nho Y. C., Lee Y. M., Shin H.: *Macromol. Biosci.* 8, 627 (2008).
9. Li M. Y., Bidez P., Guterman-Tretter E., Guo Y., MacDiarmid A. G., Lelkes P. I., Yuan X. B., Yuan X. Y., Sheng J., Li H., Song C. X., Wei Y.: *Chin. J. Polym. Sci.* 25, 331 (2007).
10. Stejskal J., Sapurina I.: *Pure Appl. Chem.* 77, 815 (2005).
11. Bidez P. R., Li S. X., MacDiarmid A. G., Venancio E. C., Wei Y., Lelkes P. I.: *J. Biomater. Sci.* 17, 199 (2006).
12. Li D. F., Wang W., Wang H. J., Jia X. S., Wang J. Y.: *Appl. Surf. Sci.* 255, 581 (2008).
13. Stejskal J., Prokeš J., Trchová M.: *React. Funct. Polym.* 68, 1355 (2008).

P. Humpolíček^{a,b}, V. Kašpárková^{a,c}, J. Stejskal^d, Z. Kuceková^{a,b}, and P. Ševčíková^c (^a Centre of Polymer Systems, ^b Polymer Centre, ^c Department of Fat, Surfactants and Cosmetics Technologies, Faculty of Technology, Tomas Bata University, Zlín, ^d Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Cell Proliferation on a Conducting Polymer (Polyaniline)**

Polyaniline (PANI) belongs to a group of conducting polymers that show numerous properties useful in biomedical applications. Although PANI has long been studied in terms of interaction with human tissue, the published studies are mostly focused on composites of polyaniline with other polymers, not allowing for generalization of the obtained results. The present study is focused on the adhesion of human liver cells to a conducting and non-conducting polyaniline films. The ability of human liver cells to attach to both types of the tested surfaces was confirmed. Cell proliferation on the PANI surfaces was monitored in relation to material biocompatibility and to its practical applications. The results showed statistically significant differences in cell proliferation depending on the type of PANI film. The study thus points out the need to test materials in their neat forms, which allow for better generalization of the test results leading to their broader applications.