

CYTOKOMPATIBILITA BIOPOLYMERU ROUBOVANÉHO Au NANOKULIČKAMI A NANOTYČINKAMI

PAVLÍNA ŽÁKOVÁ, NIKOLA SLEPIČKOVÁ
KASÁLKOVÁ, PETR SLEPIČKA a VÁCLAV
ŠVORČÍK

Ústav inženýrství pevných látek, Vysoká škola chemicko-
technologická, Technická 5, 166 28 Praha
Pavlina.Zakova@vscht.cz

Došlo 29.1.16, přijato 5.4.16.

Klíčová slova: biopolymer, expozice v plazmatu, zlaté
nanočástice, roubování, nanostruktury, cytocompatibilita

Úvod

Nanostruktury kovů patří díky svým unikátním elektrickým, optickým, magnetickým a fyzikálně-chemickým vlastnostem mezi jedny z nejvíce zkoumaných nanomateriálů pro nejrůznější aplikace od elektroniky po medicínu^{1,2}. Zejména v oblasti medicíny dochází k nejrůznějším uplatněním kovových nanostruktur. Např. nanočástice stříbra jsou známy pro své antibakteriální účinky a využívají se u obvazů na krytí ran³, komplexy obsahující nanočástice gadolinia zvyšují efektivitu při zobrazování magnetickou rezonancí a jsou součástí kontrastních látek a nanočástice zlata jsou součástí nejrůznějších detekčních testů⁴. Zlaté nanostruktury se studují a připravují s různými tvary (např. kuličky, krychle, tyčinky, hvězdy, bipyramidy)⁵ a rovněž ve formě nanovrstev⁶.

Pro buňky je atraktivní povrch substrátu, který vykazuje zejména přiměřenou smáčivost, morfologii a elektrickou vodivost⁷. Kombinací polymerního substrátu a kovu lze vytvořit atraktivní materiál s výhodnými objemovými vlastnostmi daného polymeru (např. nízkou hustotou, dobrými mechanickými vlastnostmi, flexibilitou a chemickou rezistencí), které doplňují zajímavé vlastnosti kovu (např. elektrická vodivost, povrchová struktura)⁸. Adheze mezi kovy a polymery je velmi slabá, a proto je nutné polymerní substrát před depozicí kovu modifikovat (povrchově aktivovat). Jednou z metod povrchové modifikace polymerů je jeho povrchová degradace v plazmatu. Tím dochází ke štěpení polymerních řetězců, tvorbě radikálů, dvojných vazeb a kyslíkatých polárních skupin⁹. Tyto funkční skupiny lze poté využít k roubování např. aminokyselin¹⁰, nebo polymerních řetězců¹¹ na povrch polymerního substrátu. Další možností navázání na polymerní substrát jsou např. uhlíkové nanočástice¹² popř. Au nanočástice¹³. V plazmatu aktivovaný povrch polymeru je roubován těmito nanočásticemi pomocí mediátoru, který byl roubován v 1. kroku.

Je známo, že Au není inertní, ale velmi ochotně reaguje např. s thiolovou skupinou, a v tomto případě lze použít dithiol jako mediátor, kdy jedna skupina se naváže na aktivovaný povrch polymeru a na druhou se naroubují Au nanočástice^{14,15}. Tyto substráty mohou najít uplatnění v tkáňovém inženýrství, když je nutné pěstovat buňky např. při ztrátě kožního krytu (při těžkých popáleninách, bércových vředech) a nebo při aplikaci cévních protéz.

V této práci se studují vybrané vlastnosti včetně cytocompatibility poly(3-hydroxybutyrátu) roubovaného dithiolem a poté zlatými nanočásticemi (nanokuličkami a nanotyčinkami). Byla studována povrchová smáčivost (kontaktní úhel včetně jeho závislosti na době od expozice) goniometricky, morfologie (AFM mikroskopii) a chemické složení povrchové vrstvy (XPS spektroskopii). Testy cytocompatibility (provedené *in vitro*) byly zaměřeny na sledování počtu, morfologie a životaschopnosti hladkých svalových buněk z aorty laboratorního potkana (VSMC, vascular smooth muscle cells). Z předchozích našich experimentů, které jsme prováděli s VSMC buňkami, je zřejmé, že tyto buňky jsou užitečné pro studium materiálů vhodných např. jako „scaffold“ pro cévy^{14,15}.

Experimentální část

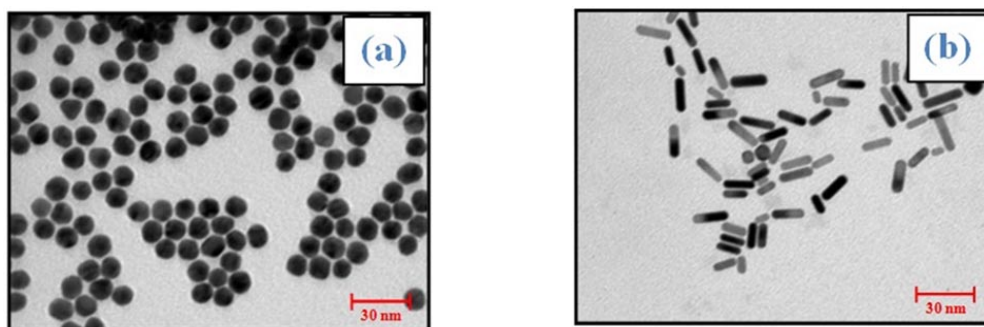
Použité materiály

K experimentům byl použit poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB) ve formě fólie (Goodfellow Ltd., UK, tloušťka 50 μm , hustota 1,25 g cm^{-3}). Fólie byla modifikována inertním argonovým plazmatem v naprašovacím zařízení Balzers SCD 050 (DC, Ar^+ plazma, čistota plynu 99,995 %, průtok plynu 0,3 l s^{-1} , tlak 8 Pa, vzdálenost elektrod 50 mm) při výkonu plazmatu 3 W a časech expozice 50, 100 a 300 s. Ihned po plazmatické modifikaci byly vzorky přeneseny do roubovacích roztoků, ve kterých byly ponechány vždy po dobu 24 h. P3HB byl roubován nejprve v roztoku 1,1'-bifenyl-4,4'-dithiolu (BFD, koncentrace $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) a následně buď (i) v suspenzi zlatých nanokuliček (AuNS, průměr 12 nm, koncentrace $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) nebo (ii) suspenzi zlatých nanotyčinek (AuNR, délka 18 až 20 nm, šířka 6 nm, koncentrace $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). AuNS a AuNR byly připraveny podle známých postupů¹³. Tvar i velikost Au nanočástic jsou patrné z výsledků transmisní elektronové mikroskopie (TEM, JEOL JEM-1010, 80 kV (JEOL Ltd., Japan), viz obr. 1).

Analytické metody

Stárnutí modifikovaných vzorků bylo studováno goniometrickým měřením. Kontaktní úhel byl měřen goniometrem See System (AdveX Instruments, ČR) nanesením kapky destilované vody o objemu 8 μl . Výsledná hodnota kontaktního úhlu je dána aritmetickým průměrem naměřených hodnot a směrodatnou odchylkou z 15 měření.

Povrchová morfologie a drsnosti povrchu substrátů byly sledovány metodou AFM na přístroji VEECO CP II



Obr. 1. TEM fotografie připravených nanočástic zlata: (a) zlaté nanokuličky, (b) zlaté nanotyčinky

pracujícím v módu tapping. Drsnost povrchu je charakterizována střední hodnotou drsnosti (R_a), která reprezentuje aritmetické průměry odchylek Z-ové souřadnice od jejich střední hodnoty.

Atomové koncentrace zlata Au(4f), kyslíku O(1s), uhlíku C(1s) a síry S(2p) na povrchu substrátů (tj. v hloubce 6–8 atomových vrstev) byly určovány metodou XPS na spektrometru Omicron Nanotechnology ESCAProbeP. Rentgenové záření bylo monochromatické s energií 1486,7 eV. Měření probíhala s krokem 0,05 eV. K vyhodnocení spekter byl použit program CasaXPS.

Testy cytotoxicity

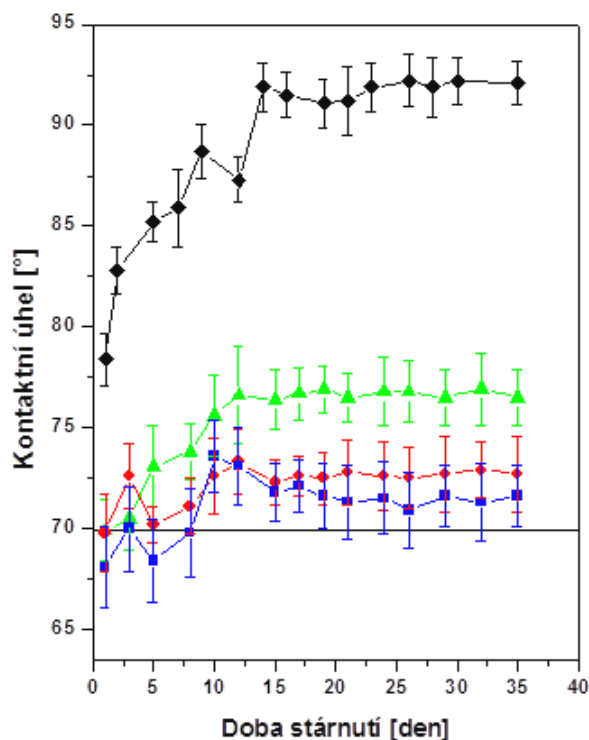
Vzorky byly sterilizovány po dobu 1 hodiny v 75% ethanolu a poté byly přeneseny do kultivačních plat z tkáňového polystyrenu. Na každý vzorek bylo nasazeno 17000 buněk na cm^2 hladkého svalstva (VSMC) z aorty laboratorního potkana. Kultivace probíhala po dobu 24, 72 a 144 hodin při teplotě 37 °C. Metoda zorných polí byla použita pro určování počtu buněk, které jsou fixovány na substrátu a obarveny, pomocí fotografií z mikroskopu. Fluorescenčním mikroskopem Olympus IX51 s digitální kamerou Olympus DP 70 bylo pořízeno 20 fotografií povrchu vzorku. Počet adherentních a proliferovaných buněk byl zjištěn počítáním buněk z fotografií softwarem NIS-Elements AR 3.0. Vylučovací test trypanovou modří byl použit ke stanovení životaschopnosti VSMC buněk¹⁶.

Výsledky a diskuse

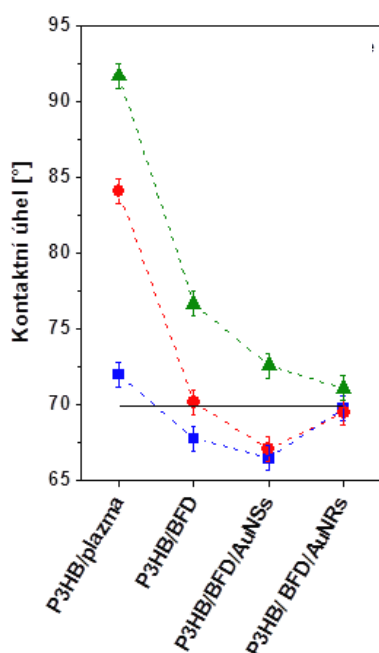
Je známo, že po expozici polymeru v plazmatu je povrch po určité době nestálý a dochází k jeho stárnutí. Po uplynutí „určité“ doby dojde v povrchové vrstvě ke stabilizaci vlastností a povrch substrátu lze považovat za vhodný ke studiu cytotoxicity^{16,17}.

Na obr. 2 je uvedena závislost kontaktního úhlu na době od expozice polymeru v plazmatu (po dobu 300 s). Z obr. 2 je patrné, že s rostoucím časem od expozice se povrch polymeru stabilizuje a dochází k ustálení hodnoty kontaktního úhlu. K ustálení dochází přibližně

15. den od expozice. U roubovaných vzorků není nárůst úhlu tak dramatický a ke stabilizaci povrchu dochází rovněž 15. den od posledního kroku modifikace. Všechny následné analýzy jsou proto prováděny na vyzrálých substrátech, tj. po 15 dnech od modifikace.



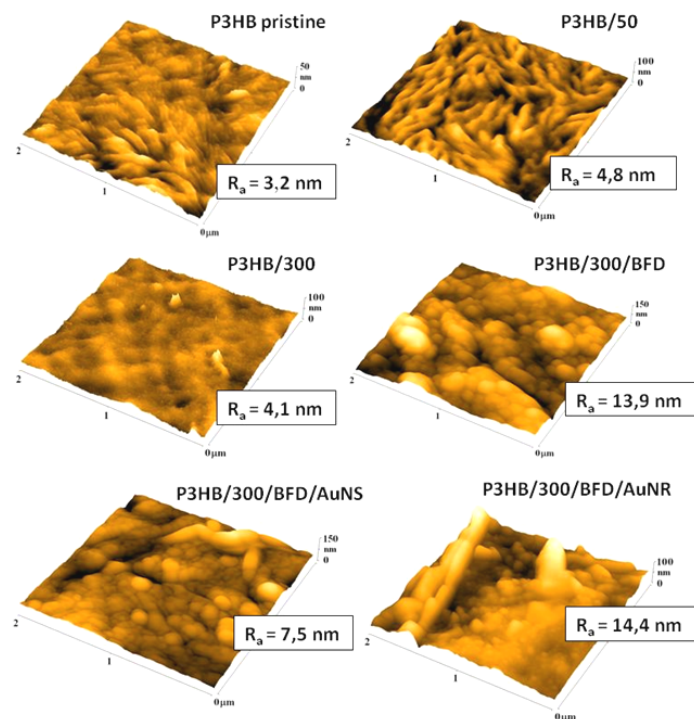
Obr. 2. Závislost kontaktního úhlu na době od expozice polymeru v plazmatu (doba stárnutí, doba expozice 300 s) pro plazmaticky modifikovaný, modifikovaný a roubovaný BFD, následně roubovaný Au kuličkami (AuNS) resp. tyčinkami (AuNR). Pro porovnání je uvedena i hodnota kontaktního úhlu nemodifikovaného P3HB; — P3HB pristine, ◆ P3HB/300, ▲ P3HB/300/BFD, ● P3HB/300/BFD/AuNS, ■ P3HB/300/BFD/AuNR



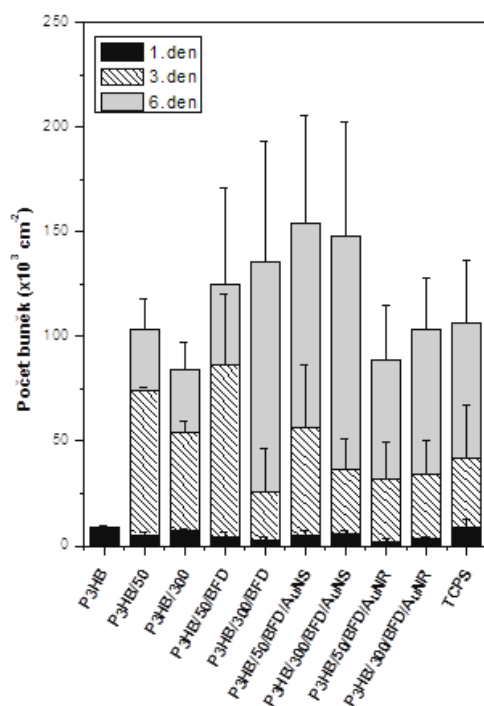
Obr. 3. Závislost kontaktního úhlu u zestárých vzorků na době expozice v plazmatu (50, 100 a 300 s) pro plazmaticky modifikovaný, modifikovaný a roubovaný BFD, následně roubovaný Au kuličkami (AuNS) resp. tyčinkami (AuNR). Pro porovnání je uvedena i hodnota kontaktního úhlu nemodifikovaného P3HB; — P3HB pristine, ■ 50 s, ● 100s, ▲ 300 s

Na obr. 3 je uvedena závislost vlivu doby expozice na kontaktní úhel pro původní a roubované (pomocí BFD resp. Au nanočástic) substráty. Z obr. 3 je patrné, že s rostoucí dobou expozice v plazmatu dochází u všech typů vzorků k růstu hodnot kontaktních úhlů. K nejvýraznějším změnám dochází u vzorků modifikovaných pouze plazmatem. V případě roubovaných vzorků dochází při kratších časech expozice v plazmatu k poklesu hodnot kontaktního úhlu v porovnání s nemodifikovaným polymerem. V porovnání se vzorkem pouze roubovaným BFD dochází po navázání AuNS k dalšímu snížení kontaktního úhlu. Po roubování AuNR není patrný výrazný rozdíl mezi hodnotami kontaktního úhlu v závislosti na době expozice v plazmatu.

Jak bylo výše uvedeno, výrazný vliv na cytocompatibilitu materiálů má jeho povrchová morfologie. AFM skeny vybraných vzorků jsou uvedeny na obr. 4. Z něj je patrné, že povrchová morfologie vzorků je výrazně ovlivněna jejich modifikací (plazma v kombinaci s roubováním). Vlivem expozice v plazmatu dochází k degradaci polymerních řetězců v povrchové vrstvě, která je doprovázena ablací povrchu polymeru^{18,19}. S rostoucí dobou expozice v plazmatu dochází k výraznějším změnám ve struktuře substrátu. Při kratší době expozice (50 s) dochází k ablaci zejména amorfní části a tím ke zvýraznění krystalické části P3HB, což je doprovázeno zvýšením drsnosti substrátu. Při delší době expozice (300 s) dochází k degradaci i krystalických oblastí polymeru²⁰, a proto dochází k nárůstu drsnosti povrchu v porovnání s nemodifikovaným polymé-



Obr. 4. 3D AFM skeny nemodifikovaného P3HB, polymeru exponovaného v plazmatu po dobu 50 a 300 s, P3HB exponovaného v plazmatu po dobu 300 s a roubovaného BFD a následně roubovaného Au kuličkami (AuNS) resp. tyčinkami (AuNR)



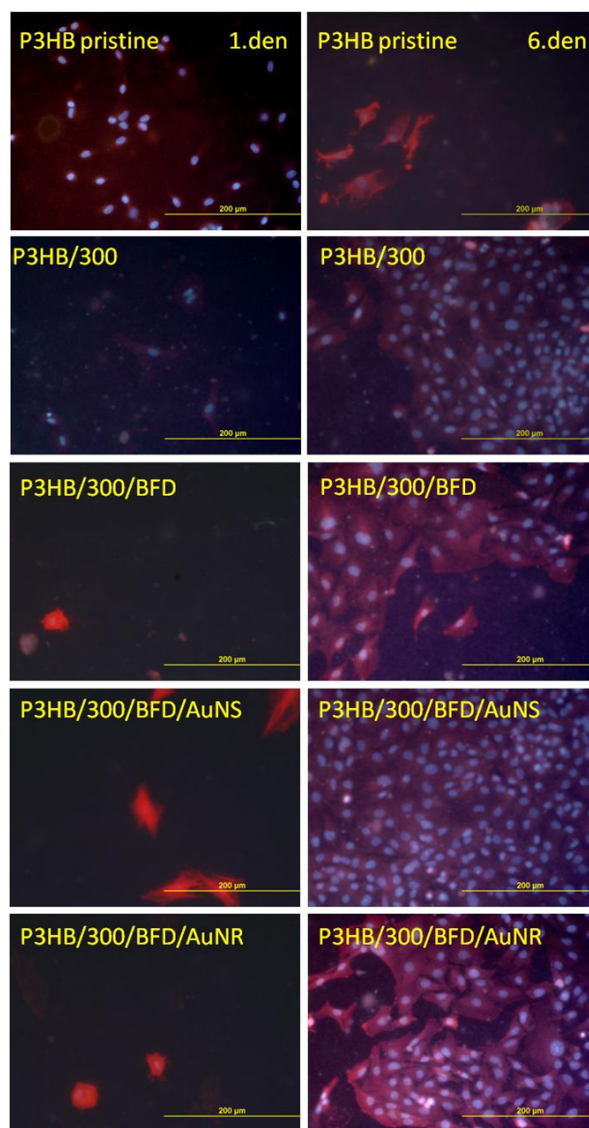
Obr. 5. Počet adheovaných (1. den) a proliferovaných (3. a 6. den) VSMC buněk na nemodifikovaném polymeru, vzorcích plazmaticky modifikovaných 50 a 300 s, modifikovaných a roubovaných BFD, následně roubovaného Au kuličkami (AuNS) resp. tyčinkami (AuNR). Pro porovnání je uvedena i stejná závislost pro tkáňový polystyren (TCPS)

rem. Při porovnání s kratší dobou expozice (50 s) je hodnota drsnosti nižší. V případě roubování BFD po dobu 300 s expozice se tvoří „kopcovité“ útvary a dochází k výraznému nárůstu drsnosti povrchu. U vzorků roubovaných oběma typy Au nanočástic je patrná odlišná morfologie povrchu substrátů. Po roubování AuNS je patrné snížení drsnosti povrchu oproti substrátu roubovanému pouze BFD. Vzorek roubovaný AuNR má oproti roubování AuNS vyšší drsnost, která je srovnatelná se vzorkem, který má navázaný pouze BFD.

Z výsledků XPS spektroskopie je zřejmé, že působením plazmatu dochází ke změně obsahu kyslíku a uhlíku na povrchu P3HB. V případě expozice po dobu 300 s dochází díky degradaci k ablaci části degradované povrchové vrstvy díky štěpení vazeb mezi atomy hlavního řetězce a vazeb směřujících k bočním skupinám nebo atomům⁹, a proto dochází k poklesu obsahu kyslíkatých skupin (z 31,0 na 22,2 at.%). Naproti tomu se zvýší obsah uhlíku z 69,0 at.% u nemodifikovaného P3HB na 78,8 at.% pro modifikovaný povrch. V případě roubování BFD z roztoku dochází k částečnému vymývání degradací vzniklých „krátkých“ segmentů z povrchu polymeru a tak se sníží obsah uhlíku na 74,0 at.%. Přítomnost navázaného BFD byla potvrzena přítomností 4,3 at.% síry na povrchu polymeru. BFD je na povrch polymeru chemicky navázan

na skupiny¹³ (radikál, dvojnou vazbu, karbonylovou, karboxylovou popř. esterovou skupinu), které vznikly při modifikaci povrchu polymeru v plazmatu. XPS analýza prokázala navázání AuNS přes mediátor BFD na povrch polymeru. Po expozici 300 s byla naměřena na povrchu polymeru koncentrace zlata 0,2 at.% (pro AuNR byla stanovena koncentrace Au na hraně detekce XPS, tj. 0,01 at.%).

Výsledky studia cytotoxicity na připravených vzorcích jsou uvedeny na obr. 5 a 6. Obr. 5 udává počet buněk stanovených po 1. dnu od nasazení buněk hladkého svalstva (adheze) a po 3. resp. 6. dnu (proliferace). Z obr. 5 je patrné, že prvních 24 h po nasazení buněk ne-



Obr. 6. Ilustrační fotografie VSMC buněk na nemodifikovaném polymeru, vzorcích plazmaticky modifikovaných 300 s, modifikovaných a roubovaných BFD, následně roubovaných Au kuličkami (AuNS) resp. tyčinkami (AuNR)

dochází k výraznějším změnám v jejich počtu, což je způsobeno uchycováním buněk na substrát. Po překonání lag-fáze (24–48 h) se buňky začínají dělit a rychle se navyšuje jejich počet²¹. Třetí den od nasazení dochází k výraznému navýšení počtu kultivovaných buněk u vzorků po všech typech modifikace. Je patrné, že na nemodifikovaném substrátu buňky neproliferují. Třetí den je nejvyšší nárůst u vzorků modifikovaných plazmatem po dobu 50 s. Po 6 dnech kultivace vykazují nejvyšší nárůst substráty s naroubovanými AuNS. Ostatní typy modifikací jsou v počtu kultivovaných buněk srovnatelné s tkáňovým polystyrenem. Výrazné odchylky jsou způsobeny nehomogenním pokrytím substrátu buňkami.

Z fotografií na obr. 6 je patrné, že k nejvíce homogenímu pokrytí povrchu substrátu buňkami dochází v případě „pouze“ plazmatické modifikace. Po roubování BFD docházelo k růstu buněk v oddělených shlucích, což zapříčinilo nehomogenní pokrytí povrchu substrátu. Preferenční růst ve shlucích je dán kombinací morfologie, smáčivosti a chemického složení povrchu substrátu, která vznikne při roubování BFD¹³. Na fotografiích substrátů s roubovanými Au nanočásticemi je patrné, že v případě AuNS docházelo k „homogennějšímu“ pokrytí povrchu substrátu v porovnání s AuNR. Buňky, které proliferují na AuNS, vykazují buněčnou morfologii, která odpovídá fyziologickému tvaru. Vykazují také preferenční růst ve vrstvách. Buňky proliferované na substrátu roubovaném pouze BFD a substrátu roubovaném AuNR vykazují výrazně větší velikost.

Výsledky životaschopnosti buněk ukazují podobné hodnoty životaschopnosti pro buňky proliferované na obou typech Au nanočástic a to cca 70 %. Životaschopnost buněk kultivovaných na tkáňovém polystyrenu byla 90 %.

Závěr

V této práci byl prostudován vliv modifikací na povrchové vlastnosti biopolymerního P3HB. Byly studovány změny povrchové smáčivosti, povrchové morfologie, chemického složení povrchu a cytocompatibilita substrátu. Z výsledků změn smáčivosti povrchu vyplývá, že k „vyzrání“ substrátů dochází 15. den od doby posledního modifikačního experimentu. Všechny roubované substráty vykazují nižší hodnoty kontaktního úhlu v porovnání s plazmaticky modifikovaným polymerem. Po roubování AuNR nedochází k výrazným změnám hodnot kontaktního úhlu v závislosti na době plazmatické modifikace. Vlivem plazmatu dochází k výraznému zvýšení drsnosti povrchu a ke změnám v poměru koncentrace kyslíku a uhlíku v povrchové vrstvě. Vzorky roubované AuNS vykazovaly koncentraci Au na povrchu 0,2 at.% a nižší hodnotu drsnosti povrchu oproti vzorku roubovaného pouze v BFD. Vzorky roubované AuNR vykazovaly obsah Au na hranici detekčního limitu XPS. V porovnání s nemodifikovaným substrátem došlo po plazmatické modifikaci a následném roubování ke zvýšení počtu nakultivovaných buněk. Po roubování AuNS vykazovaly buňky dobrou homogenitu

a fyziologický tvar. V případě roubování AuNR docházelo k proliferaci buněk, které byly výrazně větší v porovnání s buňkami po roubování AuNS.

Autoři děkují za finanční podporu grantu Ministerstva zdravotnictví ČR v projektu č. 15-33018A.

LITERATURA

1. Slepíčka P., Siegel J., Lyutakov O., Švorčík V.: Chem. Listy 106, 875 (2012).
2. Slepíčka P., Slepíčková Kasálková N., Siegel J., Kolská Z., Bačáková L., Švorčík V.: Biotechnol. Adv. 33, 1120 (2015).
3. Bindhu M. R., Umadevi M.: Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc. 135, 373 (2015).
4. Sekhon B. S., Kamboj S. R.: Nanomedicine: NBM 6, 516 (2010).
5. Dykman L., Khlebtsov N.: Chem. Soc. Rev. 41, 2256 (2012).
6. Reznickova A., Novotna Z., Slepickova Kasalkova N., Svorcik V.: Nanoscale Res. Lett. 8, 252 (2013).
7. Slepíčková Kasálková N., Buřičová L., Slepíčka P., Kolská Z., Švorčík V.: Chem. Listy 109, 878 (2015).
8. Švorčík V., Chaloupka A., Řezanka P., Slepíčka P., Kolská Z., Kasálková N., Hubáček T., Siegel J.: Radiat. Phys. Chem. 79, 315 (2010).
9. Švorčík V., Kotál V., Slepíčka P., Bláhová O., Šutta P.: Polym. Eng. Sci. 46, 1326 (2006).
10. Švorčík V., Hnatowicz V., Stopka P., Bačáková L., Heitz J., Ryssel H.: Radiat. Phys. Chem. 60, 89 (2001).
11. Kasálková N., Makajová Z., Slepíčka P., Kolářová K., Bačáková L., Pařízek M., Švorčík V.: J. Adhes. Sci. Technol. 24, 743 (2010).
12. Švorčík V., Hubáček T., Slepíčka P., Siegel J., Kolská Z., Bláhová O., Macková A., Hnatowicz V.: Carbon 47, 1770 (2009).
13. 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 Phys. Res., Sect. B 267, 1904 (2009).
14. Slepíčková Kasálková N., Slepíčka P., Kolská Z., Sajdl P., Bačáková L., Rimpelová S., Švorčík V.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 272, 391 (2012).
15. Slepíčka P., Michaljaničová I., Slepíčková Kasálková N., Kolská Z., Rimpelová S., Ruml T., Švorčík V.: J. Mater. Sci. 48, 5871 (2013).
16. Švorčík V., Makajová Z., Slepíčková Kasálková N., Kolská Z., Žáková P., Karpíšková J., Stibor I., Slepíčka P.: Carbon 69, 361 (2014).
17. Siegel J., Řezníčková A., Chaloupka A., Slepíčka P., Švorčík V.: Radiat. Eff. Defects Solids 163, 779 (2008).
18. Slepíčka P., Trostová S., Slepíčková Kasálková N., Kolská Z., Malinsky P., Macková A., Bačáková L., Švorčík V.: Polym. Degrad. Stab. 97, 1075 (2012).

19. Slepíčka P., Trostová S., Slepíčková Kasálková N., Kolská Z., Sajdl P., Švorčík V.: *Plasma Proc. Polym.* 9, 197 (2012).
20. Slepíčka P., Malá Z., Rimpelová S., Slepíčková Kasálková N., Švorčík V.: *React. Funct. Polym.* 95, 71 (2015).
21. Michaljaničová I., Slepíčka P., Slepíčková Kasálková N., Sajdl P., Švorčík V.: *Vacuum* 107, 184 (2014).

P. Žáková, N. Slepíčková Kasálková, P. Slepíčka, and V. Švorčík (*Department of Solid State Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Cytocompatibility of Biopolymer Grafted with Au Nanospheres and Nanorods**

We studied the surface properties and cytocompatibility of a grafted biopolymer, poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB). P3HB was exposed to an inert argon plasma discharge, then grafted by 1,1'-biphenyl-4,4'-dithiol (BFD) and finally grafted by golden nanoparticles (nanospheres and nanorods). The surface properties were studied using multiple methods – goniometry, atomic force microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. Cytocompatibility was determined *in vitro* by studying adhesion, proliferation and viability of vascular smooth muscle cells (VSMCs) from the aorta of *Rattus norvegicus*. The cytocompatibility was compared for pristine, modified P3HB and standard tissue culture polystyrene (TCPS). Our results show that surface morphology and wettability are affected by both plasma discharge and nanoparticles grafting. These changes suggest that the adhesion and proliferation of VSMCs is enhanced more on the plasma modified and grafted substrate.